N° d'enregistrement
au CNRS A.O.I0760

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES

MENTION BIOCHIMIE-BIOLOGIE

CELLULAIRES

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS VI

par

MONSIEUR PHAM QUANG LIEM

pour obtenir

le grade de Docteur es-sciences

Sujet de la thèse : ETUDE DES LIPIDES POLAIRES

DES TROIS FUCACEES DES COTES BRETONNES :

. Pelvetia canaliculata (L) Decn et Thur

. Fucus vesiculosus (L)

. Fucus serratus (L)

I. Etudes des structures
II. Localisation et répartition cytologiques
III. Variations des teneurs et compositions selon les conditions écologiques et expérimentales

---

Soutenue le 9 Décembre I974 devant la composition d'examen :

MM. J. FELDMANN Président

J.E. COURTOIS Invité d'honneur

P. MAZLIAK Examinateurs

H. MARCOVICH "

Mme M.H. LAUR "

N° d'enregistrement
au CNRS A.O.I0760

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES

MENTION BIOCHIMIE-BIOLOGIE

CELLULAIRES

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS VI

par

MONSIEUR PHAM QUANG LIEM

pour obtenir

le grade de Docteur es-sciences

Sujet de la thèse : ETUDE DES LIPIDES POLAIRES

DES TROIS FUCACEES DES COTES BRETONNES :

. Pelvetia canaliculata (L) Decn et Thur

. Fucus vesiculosus (L)

. Fucus serratus (L)

I. Etudes des structures
II. Localisation et répartition cytologiques
III. Variations des teneurs et compositions selon les conditions écologiques et expérimentales

---

Soutenue le 9 Décembre I974 devant la composition d'examen :

MM. J. FELDMANN Président
J.E. COURTOIS Invité d'honneur
P. MAZLIAK Examinateurs
H. MARCOVICH "
Mme M.H. LAUR "

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT - PROPOS

A mes Parents
A ma Femme et à ma Fille
A mes Frères et Soeurs
en témoignage de profonde affection

- A Madame Marie-Hélène LAUR ,initiatrice de ce sujet de thèse ,dont la vigilante sollicitude durant sept années a permis la réalisation de ce travail,
- A Monsieur NGUYEN VAN THOAI ,pour ses précieux conseils et toute sa sollicitude bienveillante,

je leur exprime: gratitude et amitié

- A Monsieur le Professeur Jean FELDMANN qui me fait l'honneur de présider le Jury de ma thèse
- A Monsieur le Professeur Emile COURTOIS,
- A Monsieur le Professeur Paul MAZLIAK,
- A Monsieur le Professeur Herbert MARCOVICH,

pour leur bienveillante attention, et
l'honneur qu'ils me font en acceptant d'être examinateurs,
j'adresse mes plus vifs remerciments

- A Monsieur le Professeur Alain COLLENOT ,j'adresse mon témoignage bien reconnaissant.
- A mes nombreux camarades des Laboratoires de:
BIOCHIMIE CELLULAIRE du COLLEGE DE FRANCE ,du C.H.U. de COCHIN qui m'ont témoigné tant de gentillesse: je leur dédie cette thèse
- Je remercie tout spécialement Mesdames C.PERGRALE,S.CLAVAUD,M.FIGUEIREDO, SCHOTTER, Made moiselle C.ABELARD qui m'ont apporté une si précieuse aide soit pour la réalisation technique au laboratoire,soit pour la mise en page de mon travail,sans oublier G.GUGLIEMI,précieux photographe ainsi que tout le personnel enseignant et technique du Laboratoire de BIOLOGIE VEGETALE MARINE

PLAN GENERAL DE LA THESE

I. Introduction

II. Matériels et méthodes

III. Première partie

- Structures et formules proposées des lipides polaires de Pelvetia canaliculata (L) Decn et Thur.
- Identification comparative des lipides polaires de Fucus vesiculosus et de Fucus serratus.

IV. Deuxième partie

Etudes de la répartition intracellulaire des différents lipides polaires chez les trois espèces choisies

1) au niveau des chloroplastes
2) au niveau des mitochondries
3) au niveau d'autres formations cytoplasmiques dans leur ensemble.

V. Troisième partie

- Etudes de la variation des teneur et composition des lipides polaires au cours des saisons.
- Etudes de la variation en fonction de certains facteurs écologiques, et de certaines conditions particulières pour chaque espèce d'algue choisie.
- Détermination expérimentale de la variabilité des teneur et composition en lipides polaires chez les trois algues,
  - a) avec la lumière artificielle complète, partiellement sélective par filtrage.
  - b) en fonction des rythmes circadiens
    - . d'émersion et immersion
    - . d'éclairage et d'obscurité
  - c) effets des carences en soufre et en phosphore sur la biosynthèse des lipides polaires soufrés et phosphorés et leur répercussion sur l'ensemble de ces substances.
  - d) applications de la méthode de marquage radioisotopique à la détermination des variations des teneur et composition des lipides polaires pendant et avant les carences expérimentales, ainsi que les interférences sur les métabolismes des autres substances soufrées et phosphorées non lipidiques.

VI. Conclusions générales

VII. Bibliographie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542722_0039

TABLE DES MATIERES

pages

- Introduction I
- Matériels et méthodes I0
- Première partie 45
  - Profil des lipides polaires des 3 Fucacées 46
  - Etude des structures des lipides polaires de Pelvetia canaliculata 48
  - Applications à la détermination des structures des lipi des polaires séparés. 5I
  - Etudes comparatives des lipides de F.vesiculosus et de F.serratus. 70
  - Composition et teneur des lipides des 3 groupes chez les 3 algues 74
  - Conclusions.
- Deuxième partie 76
  - Etudes de la distribution intracellulaire des lipides polaires de :
    - A. Pelvetia canaliculata
    - B. Fucus vesiculosus
    - C. Fucus serratus
  - Conclusions. 83
- Troisième partie. 85
  - Etudes des variations au cours des 4 saisons. 86
  - Etudes expéri .tales en fonction de certains facteurs écologiques. 108
  - Etudes des effets de carence en soufre et en phosphore. 142 155
  - Applications de la technique de marquage par des radioéléments à l'étude de la variation des teneur et composition en lipides polaires chez les trois algues. 161
- Conclusions générales. P 177
- Bibliographie. P 180

I N T R O D U C T I O N

Les lipides ou corps gras constituent tout comme les protides et les glucides une catégorie de substances présentes dans la matière vivante. Alors que glucides et protides forment des familles homogènes, donnant par hydrolyse des résidus peu nombreux, en général hydrosolubles. Les lipides au contraire, sont des substances insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques. Par hydrolyse, les lipides donnent des résidus très divers . Généralement formés par une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, très hydrophobes, certains lipides possèdent toutefois une bipolarisation très nette de leur molécule.

Connus depuis très longtemps, cependant en ce qui concerne la structure et les rôles biologiques des lipides complexes, ce sont les recherches récentes et actuelles qui ont mis l'accent sur leur importance. .

Il est d'usage aujourd'hui de classer les lipides en :

- lipides neutres ou apolaires
- lipides polaires ioniques ou non ioniques

Les lipides neutres: ce sont principalement,

. les glycérides
. les stérides
. les cérides
. les hydrocarbures paraffiniques et oléfiniques
. les alcools gras

Les glycérides (mono-di-triglycérides), substances de réserve hydrocarbonées et énergétiques, sont très abondantes dans les graines des plantes oléagineuses et dans les tissus adipeux des animaux, où ils peuvent atteindre jusqu'à 80 % des lipides totaux. Dans les gamètes et les oeufs les réserves glycéridiques sont encore en quantité très importantes. Elles sont indispensables au développement des embryons.

En milieu aqueux, ces substances très hydrophobes ne présentent pas de dispersion, mais se regroupent en une phase unique, nettement séparée de la phase aqueuse. Les stérides et les cérides sont des substances plus complexes, jouant un rôle prépondérant dans les revêtements protecteurs des différents organes végétaux.

et animaux (épidermes, cuticules etc...). C'est au travers de ces couches lipidiques protectrices que se font les échanges gazeux entre l'atmosphère et les cellules sous-jacentes de l'organisme.

Les hydrocarbures, les alcools gras, les cétones, les aldéhydes sont des composés de poids moléculaires très élevés. Leurs propriétés physiques sont néanmoins tres voisines de celles des cérides naturels: non mouillables, insolubles dans l'eau, structures cristallines ou pseudocristallines à température ordinaire.

Les lipides polaires: sont classés parmi les lipides polaires,

- les phospholipides
- les sulfolipides
- les cerebrosides
- les sphingolipides
- les inositides.

Présents dans toutes les cellules vivantes, leur teneur peut dépasser les 50 % des lipides totaux, en particulier dans les thalles végétatifs des algues brunes et des algues rouges. De plus pour ces végétaux, les teneurs en lipides polaires sont d'autant plus élevées que les thalles sont plus jeunes, physiologiquement actifs .

La plupart des lipides polaires ont un rôle structural et organisateur primordial, contribuant à donner aux cellules une sorte de frontière physiologique efficace, douée d'une perméabilité sélective pour les substances hydrophobes; En outre les lipides polaires ioniques peuvent s'opposer à la diffusion des ions à travers les membranes biologiques. L'action "Zwittérionique" de ces lipides intervient en outre, très probablement, dans le passage ordonné des electrons dans les chaînes des transporteurs électroniques, assurant un transfert énergétique efficace au niveau des membranes spécialisées (GREENFLEISCHER 1963).

Les molécules des lipides polaires-composés au moins quaternaires-sont très complexes. L'azote peut secondairement faire partie de la molécule. Le phosphore comme le soufre, au contraire, sont intégrés aux molécules sous forme de restes d'acides (phosphorique , sulfurique et sulfonique.). Les lipides polaires possèdent en outre dans leurs molécules une queue hydrophobe et une tête hydrophile. Cette dernière comporte des groupements fonctionels ionisés ou facilement ionisables présentant une polarité très

nette, due soit aux restes d'acides, d'alcools phosphorylés ou sulfates, soit aux restes d'alcools aminés phosphorylés. Les restes glucidiques des glycolipides et des cérébrosides peuvent aussi constituer les têtes polaires de ces molécules.

La queue apolaire comporte des restes d'acides gras saturés ou insaturés, ou de longues chaînes soit cycliques soit aliphatiques. Elle peut être formée aussi par un diacyl, un acyl-alkyl ou un dialkyl-glycérol saturé ou insaturé, dans le cas des plasmogènes par exemple. Dans le cas des sphingolipides et des cérébrosides, la queue apolaire est constituée du reste N-acyl-sphindosine.

La presence d'une tête polaire et d'une queue apolaire confère à ces molécules une bipolarité très nette. En solution aqueuse, les lipides polaires presentent des dispositions structurales particulières par dispersion dans l'eau en raison de leur caractère amphiphile. Enfin les differents lipides polaires se trouvent répartis dans toutes les membranes des cellules vivantes de façon caractéristique. Ainsi les phospholipides sont partie constitutive des membranes protoplasmiques, ceci est connu depuis la fin du siècle dernier. DAWNSON et DANIELLI en 1934, n'ont-ils pas proposé un modèle de membrane plasmique, partant des considérations des valeurs de la tension superficielle des oeufs de poisson plonges dans l'eau?. La membrane de ces oeufs constituée de phospholipides, forme un feuillet bimolèculaire, bordé de part et d'autre par des substances protidiques.

GREEN en 1966, étudiant le fonstionnement des chaînes de transporteurs d'électrons dans les membranes mitochondriales, a proposé un autre modèle de membrane lipoprotidique, dont les phospholipides seraient liés aux protéines par des liaisons hydrophobes.

En fait on trouve des phospholipides dans les membranes de tous les organites cellulaires animaux et végétaux. Les glycolipides et sulfolipides se rencontrent surtout dans les lamelles et les granas des chloroplastes, la plupart du temps associés aux galactosylsdiglycérides (MGDG et DGDH).

Signalons aussi que les sphingolipides et les cérébrosides existent aussi bien dans les cellules animales que dans les cellules végétales (HAINES T. et H. JENSEN 1958). Dans les cellules végétales ils sont présents en très faible quantite, et nos connaissances y sont encore très imprecises. L'étude des lipides

a connu un grand essor, simultanément dans le règne animal puis dans le règne végétal. Les végetaux inférieurs ont par ailleurs peu intéressé les chercheurs jusqu'au siècle dernier, mais depuis quelques décades, ils ont fait l'objet d'un bon nombre de travaux importants, en particulier les algues marines (LOVERN en 1936, BENSON et SHIBUYA en 1962 , LAUR en 1965, WAGNER et POHL en 1964 et 1968, CHULCAS et RILEY 1966 etc...).

Concernant les lipides neutres, CHEVREUL en 1823 puis BERTHELOT en 1854 ont montré que les graisses naturelles sont des esters du glycérol et des acides gras. La composition en acides gras selon ces auteurs est variable et dépend de l'origine des glycérides considérés. Le rôle de ces glycérides est bien défini en tant que réserve énergétique , isolement thermique et protection des choss mécaniques. L'etude systématique est faite de nos jours, autant du point de vue structural que métabolique. Les lipides polaires sont encore aujourd'hui assez mal connus, les études les concernant restent fragmentaires.

Parmi ces lipides les phospholipides sont les mieux étudiés, la structure et le métabolisme de la plupart d'entre eux sont connus dans les détails. De même les rôles des lipides polaires dans la physiologie sont précisés. On sait par exemple que les phospholipides font partie de la composition des chylomicrons à côté du complexe lipoprotéine-glycéride.

KENNEDY EN 1953 a montre que l'incorporation de P_{32} minéral dans les phosphatides en présence des mitochondries est augmentée si on ajoute du glycérol. L'action catalytique d'un nucléotide à base de cytosine indispensable à la phosphorylation oxydative a été aussi démontrée par cet auteur pour la première fois. Les réactions suivantes ont été mises en évidence dans la biosynthèse des phosphatidylcholines par exemple:

1) CMP ....→ Cytidine 5' triphosphate + Phosphorylcholine .....→ Cytidyldiphosphorylcholine + PP

2) Cytidine diphosphorylcholine + diglycéride ...→ Lècithine + cytidinemonophosphate (CMP)

DAWNSON en 1957 a démontré que tous les tissus sont capables de synthétiser les phospholipides.

KLENK en 1932 avait déjà constaté que la composition en acides gras des phosphatides est nettement distincte de celle des glycérides. Les rôles des phospholipides, très divers, sont actuellement bien connus.

MAYER et SCHAFFER dès 1914 montraient que les phospholipides font partie des membranes cellulaires, du noyau et des mitochondries en particulier et jouaient entre autres un rôle certain dans le transport ionique à travers les membranes. SALOMON et FRAZER à leur tour ont démontré que les phospholipides interviennent dans le transport des glycérides dans le sang en formant à la surface des chylomicrons une fine couche stabilisatrice.

BEST en 1932 constatait que la lécithine a une action lipotrope et fait baisser la teneur en graisse dans le foie des animaux à foie gras experimental. En général, il a été démontré que les phospholipides favorisent la mobilisation des graissses accumulées dans certains organes. Enfin les rôles des phospholipides en tant que constituants de certaines enzymes mitochondriales tel les que la succinodéshydrogénase, l'adénosinetriphosphate, l'acyl-CoA synthétase etc... sont aussi connus depuis longtemps. La participation des phosphatidyléthanolamines à la coagulation du sang montre en outre la vive activité métabolique des phospholipides chez les êtres vivants.

Les glycolipides d'origine animale tels que les sphingolipides, la cérasine, les gangliosides, sont aussi bien connus. Les études métaboliques, structurales de ces substances ont été faites par de nombreux chercheurs. Les glycolipides d'origine végétale sont au contraire bien moins connus, mais les efforts des biologistes végetalistes menés de concert pour etudier ces substances très abondantes dans le règne végétal, commencent à porter fruits.

Si les phospholipides et lycolipides sont relativement bien étudiés par un nombre croissant de chercheurs les sulfolipides sont malheureusement moins bien connus. Depuis la decouverte de THUDICHUM en 1870 dans les lipides du cerveau et jusqu'en 1958 ces constituants n'ont pas été identifiés ailleurs que dans le cerveau. Mais depuis queques annees les sulfolipides ont été trouvés dans plusieurs tissus animaux et végétaux et même chez les bactéries et les champignons. Certes comparativement aux phospholipides qui ont eu un développement prépondérant, les connaissances acquises sur les sulfolipides sont pauvres. L'inactivité totale manifestée à l'égard de ces substances pendant plus de quatre vingts ans est due au manque d'intêret que les chercheurs ont porté sur ces substances. La reconnaissance du rôle primordial des lipides polaires constituants des membranes vivantes, a fait relancer les études des sulfolipides. Les travaux de BENSON et coll

sur les sulfolipides des plantes, ceux de HAINES et de son équipe, ont motivé ces regains importants de considération pour ces substances.

En 1961 d'autres sulfolipides ont été trouvés et la modification de nos connaissances dans ce domaine est radicale. De nos jours treize sulfolipides ont été identifiés, mais leurs rôles ne sont pas très bien connus et leur structure encore très imparfaitement établie.

Depuis plusieurs années, nous nous sommes intéressés aux lipides des algues marines et plus particulièrement à ceux des algues brunes des côtes bretonnes. Au cours de nos travaux, nous avons pu constater que ces végataux marins présentent des teneurs et compositions lipidiques très variables. Les variations ont lieu au niveau des espèces, et ce, en relation étroite avec l'écologie de chacune d'elles. Les différences sont en outre, significatives au cours du cycle biologique annuel de l'espèce considérée.

Les mécanismes d'action des différents lipides polaires en tant que constituants membranaires ou protoplasmiques ne sont pas encore élucidés de façon satisfaisante. L'hypothèse que ces substances qui participent à un transport actif en qualité de pourvoyeur d'énergie, relève d'un processus universel, souvent vérifié. Une étape analytique par l'emploi des traceurs radioactifs permettrait de connaître les rôles possibles des différents lipides polaires dans la biologie cellulaire des algues marines. Notre premier objectif a été de vérifier les corrélations qui existent entre teneurs et compositions des différents lipides polaires et l'écologie de chaque espèce et si possible de savoir comment ces lipides polaires interviennent dans la physiologie des algues suivantes:

1° Pelvetia canaliculata (L.) Decn. et Thur.
2° Fucus vesiculosus (L.)
3° Fucus serratus (L.)

Ce travail comporte trois partie principales:

Première partie

Détermination des structures et établissement des formules des lipides polaires, des thalles jeunes de Pelvetia canaliculata (L.) Decn. et Thur. Identifications par comparaison, des lipides trouvés chez les Fucus vesiculosus et Fucus serratus.

Deuxième partie

Etudes des répartitions intracellulaires des lipides polaires trouvés chez les trois algues au niveau des organites cellulaires suivants:

1) chloroplastes
2) mitochondries
3) autres formations cytoplasmiques nnn chloroplastiques.

Troisième partie

Etudes des variations de la teneur et composition des lipides polaires au cours des différentes saisons [illegible] et en fonction des differentes conditions écologiques, particulières à chaque espèce.

Etudes de la variabilite des teneur et composition des lipides polaires dans les conditions experimentales suivantes:

1) éclairages artificiels, effets des lumières utiles ou nocives pour chacune des trois espèces.
2) alternances rythmées de la lumière et de l'obscurité, de l'emersion et de l'immersion
3) effets des carences en soufre et en phosphore sur la biosynthèse des lipides polaires dans leur ensemble, et sur la variation de leur teneur et composition chez les trois espèces ainsi que la répercussion générale sur le métabolisme des composés organiques soufrés et phosphorés non lipidiques.

Nous espérons par ce travail contribuer tant soit peu à l'étude des lipides polaires, ces derniers jouent un rôle prépondérant comme constituants membranaires d'abord et comme substances plastiques et catalytiques ensuite. Certains problèmes affiliés notamment les perméabilités des drogues et des substances toxiques, ainsi que les tautomérisations de certaines molécules, pourraient trouver des explications valables avec les études approfondies des différents lipides polaires surtout les lipides sulfonatés dont le potentiel de réa ctivité chimique est très élevé. Vu l'importance capitale des lipides polaires, en particulier des lipides soufrés à propos desquels notre ignorance est grande nous souhaitons voir ce travail motiver un regain d'interêt, afin de pallier rapidement aux retards de nos connaissances dans ce domaine.

MATERIELS ET METHODES

I - MATERIELS

1 - Choix des espèces p.10
2 - Récoltes p.11
3 - Echantillonnage et conservation p.12
4 - Produits chimiques utilisés p.12

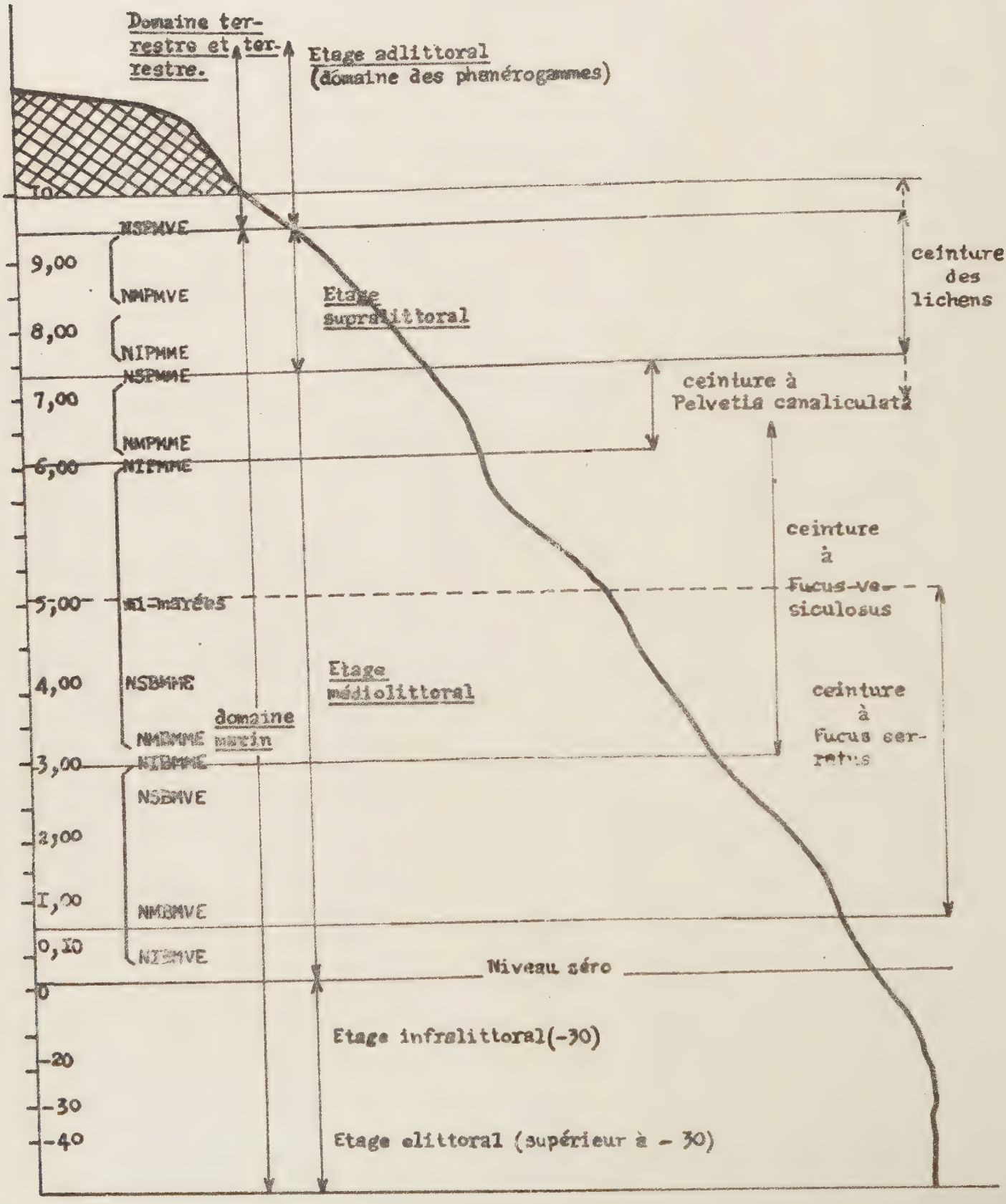
II - METHODES

1 - Extractions des lipides p. 12
2 - Séparations lipides / contaminants non lipidiques p. 13
3 - Préfractionnement des lipides neutres et des lipides polaires totaux p.14
4 - Fractionnement des lipides polaires en classes individuelles p. 15
. Séparations des constituants de la fraction f_2 p.15
. Séparation des lipides polaires des fractions $f_3 + f_4$ p. 16
5 - Purifications des lipides isolés - Critères de pureté des substances isolées p.17
6 - Déterminations des structures des différents lipides polaires p.19
7 - Analyses et dosage élémentaires p.19
. Dosage du soufre p.20
Etudes des états du soufre dans les molécules des sulfolipides p.22
. Dosage du phosphore p.25
. Dosage de l'azote p.26
. Dosage du carbone, de l'oxygène et de l'hydrogène p. 27
8 - Analyses et dosages des constituants moléculaires dans les fractions séparées et purifiées p.27
. Analyses et dosages des acides gras p.28
a) détermination du PM p.29
b) mesure de l'indice d'iode p. 29
c) mesure de l'indice d'acetyle p. 29

d) séparation et dosage des acides gras.p.30
. Dosage du glycérol p.30
. Dosage de la choline p.31
. Dosage de l'éthanolamine et de la sérine p.31
. Dosage de la sphingosine p. 32
. Dosage des aldéhydes gras p.32
. Dosage de l'inositol p.33
. Dosage des glucides p.33
Méthodes employées : p.35
Oxydation périodique p. 36
Déterminations des liaisons Glucides-O - S et des liaisons O - Sulfates p.37
1/ vitesse d'hydrolyse en milieu acide p.37
2/ spectre infra-rouge p.37
3/ dégradation enzymatique p37
Distinctions entre sulfates et sulfonates p.37
I / caractérisations des sulfates: p.38
point de fusion p.38
séparation par chromatographie sur papier et électrophorèse p. 38
spectre I R p.39
oxydations périodiques p.40
hydeolyses acides p.40
hydrolyses alcalines p.40
acétonolyse et méthanolyse p.41
désulfatation réductive p. 41
II / caractérisations des sulfonates esters p.42
spectre I R p.42
désulfonation du groupe sulfonyl p.42
actions de quelques réactifs alcalins p.43
méthodes analytiques des sulfonolipides p. 43

PLANCHE I.

Zonation des ceintures d'algues sur les côtes de la Manche d'après les données de J. FELDMANN



MATERIELS ET METHODES

I - Matériels

Au cours des études antérieures sur les lipides des algues marines nous avons constaté que les teneurs et compositions des lipides polaires sont variables d'une espèce à l'autre. Cette variation semble dependre avant tout des conditions écologiques liées à l'habitat de l'espèce considérée. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons été amenés à choisir les trois espèces d'algues brunes des côtes bretonnes suivantes :

1° Pelvetia canaliculata (L.) Decn. et Thur.
2° Fucus vesiculosus (L.)
3° Fucus serratus (L.)

Ces trois Fucacees sont des algues de faible profondeur. Bien qu'appartenant à la même famille, elles ont chacune un habitat propre, formant des "ceintures" tout au long du littoral, dans la zone de balancement des marées des hautes et basses mers. Soumises aux conditions de luminosité locale, des microclimats, de la salinité des eaux et aux rythmes journaliers des marées, spécifiques à chacun des habitats de ces algues (1), les trois espèces choisies nous paraisent tout indiquees pour nos études des lipides, en ce qui concerne les variations des teneurs et compositions des lipides polaires en rapport avec l'ecologie de l'espèce.

Par rapport à la côte et suivant la coupe (planche 1) nous pouvons constater que:

- Les Pelvetia canaliculata (L.) Decn. et Thur. sont des algues de surface. Elles occupent des localités abritées, se trouvent dans la limite supérieure de la région littorale. Cette zone est caractérisée par des changements quotidiens du niveau d'eau. Aux marées hautes seulement les Pelvetia canaliculata sont recouverts par une épaisseur d'eau de 10 - 20 cm, variable selon les saisons, la période de l'année et l'amplitude des marées. Aux basses mers des grandes marées, les Pelvetia canaliculata sont laissés à découvert pendant toute la durée des basses eaux c'est à dire de 8 à 12h consécutives par 12h et selon les conditions météorologiques locales. En mortes eaux elles ne sont pas recouvertes par l'eau de mer. Les facteurs illuminations de la localité, salinité

des eaux, régulière ou irrégalière, jouent un rôle fondamental dans la biologie des Pelvetia canaliculata et paraissent déterminants dans l'écologie de cette espèce supralittorale

- Les Fucus vesiculosus (L.) occupent la zone inférieure intermédiaire et sont totalement exondes durant les basses mers, mais la durée totale des expositions à l'air libre de cette espèce est plus courte que pour les Pelvetia canaliculata. La quantité de lumière reçue quotidiennement par unité de surface est pour Fucus vesiculosus plus faible que pour P. canaliculata. Par contre les couches d'eau qui les recouvrent journellement sont plus importantes.

- Les Fucus serratus (L.) occupent la limite inferieure de la zone littorale. Durant les basses mers des grandes marées seulement ils sont exondés entièrement, le reste du temps les Fucus serratus sont immergés sauf ceux qui vivent dans les flaques d'eau. La quantité de lumière reçue par 24h et par unite de surface est quantitativement faible et qualitativement différente du fait de l'absorption par l'eau de certaines lumières visibles.

Compte tenu de tous ces facteurs qui varient journalièrement et saisonnièrement, leur influence sur la physiologie de chacune des espèces est certaine. Il en résulte des variations des rythmes biologique tres diverses auxquelles les différentes espèces sont appelées à s'accommoder, créant avec le milieu et à défaut duquel la longueune espèce d'équilibre l'espèce ne pourrait survivre. La corrélation ponderale entre les lipides polaires et le mode devie de chacune des trois algues en est une des conséquences directes qu'il nous reste à prouver au cours de ce travail.

I - 1. Récoltes

Les trois Fucacées étudiées proviennent de la Station Biologique que de Roscoff et de l'Institut de Biologie Marine de Concarneau. Les récoltes sont faites régulièrement une fois par mois entre Janvier 1970 et Mars 1972 toujours dans les mêmes lieux dans les environs immédiats de Roscoff. Ces lots ont été employés pour la première partie de notre étude jusqu'en 1973. Les lots récoltés à Concarneau ont ete utilisés notamment pour les cultures expérimentales et les marquages isotopiques. Les matériels récoltes-environ un kilogramme d'algues fraîches par lots-sont triés soigneusement de façon à avoir des thalles très jeunes aux stades d'évolution aussi proches que possible pour les trois espèces.

Les thalles sont ensuite lavés proprement à l'eau de mer, stérilisés et séchés à 60°C sous vide pendant 48 à 72 heures. Les algues séchées sont ensuite réduites en poudre fine par broyage.

1 - 2. Echantillonnage et conservation.

Les différents échantillons sont conservés en flacons colorés à 4°C jusqu'à utilisation. En outre ces flacons sont maintenus hermétiquement fermés et gardés à l'abri de la lumière autant que possible. Cette technique de conservation permet de garder très longtemps intacte la quasi totalite des lipides, nous l'avons vérifié, même après un an de stockage.

I - 3. Produits chimiques utilisés

Tous les solvants organiques utilisés doivent être tres purs, le chloroforme (R P) ou C.Erba, redistillé au préalablesur l'hydroxyde de potassium. De même l'éthanol et le méthanol (P A) sont redistilles extemporanément en présence de zinc. Toutes les solutions sont fraîches et sont préparées juste avant utilisation sauf celles qui doivent être mûries préalablement.

II - Méthodes d'études des lipides polaires

II - 1. Extractions

Les algues marines comme toutes les plantes aquatiques, sont riches en eau et pauvres en lipides. L'extraction est de ce fait rendue difficile, surtout pour atteindre la totalité des lipides polaires, ces derniers plus ou moins fragiles, sont thermodégradables notamment les lipides polaires fortement insaturés et ioniques. Par les methodes classiques d'extraction à froid au méthanol/chloroforme 1/2 (v/v), longues et nécessitant de grandes quantités de solvants, les résultats restent médiocres: les lipides polaires ne sont extraits qu'en partie, leurs pertes sont considerables elles peuvent atteindre 30 % de la teneur totale, dans la plupart des cas. De plus certains sulfolipides et glycolipides ne sont pas extraits par ce mélange, leurs pertes relatives sont élevees quantitativement et qualitativement. Nous avons donc été amenés à mettre au point une technique appropriee, efficace et rapide. Cette méthode d'extraction (2), nous a permis

d'extraire en quelques heures, la quasi totalité des lipides, dans des conditions relativement douces et avec une quantité minime de solvant. Dans les extraits ainsi obtenus, nous pouvons récupérer environ 90-95 % des lipides polaires totaux, parmi lesquels figurent la quasi totalité des sulfo-et glycolipides. L'inconvénient, non négligeable d'ailleurs, reste que des substances non lipidiques sont aussi extraites par les solvants polaires à chaud, et en quantite important, posant de sérieuses dificultés lors de la purification adéquate de la fraction lipidique.

La méthode de lavage de FOLCH et LEE (3-5) ne peut être utilisée ici car les pertes dans la phase aqueuse sont difficilement récupérables. Les émulsions formées par les lipides polaires en milieu aqueux et en présence de sels minéraux ne sont pas faciles à casser, surtout avec les lipides fortement polaires tels que les esters sulfates et sulfonates. La dialyse est à exclure car les membranes colloïdales ne sont pas adaptées à l'emploi de solvants organiques. Seules la filtration sur gel Sephadex est efficace, il faut toutefois encore adapter cette technique quand on emploie les solvants organiques. Nous avons donc mis au point une méthode de filtration sur gel Sephadex G 25 type fin (6-7) ou Sephadex G 50 type fin ou très fin. Les résultats obtenus sont satisfaisants quoiqu'imparfaits encore à certains égards.

II - 2. Séparations lipides/contaminants non lipidiques

Les extraits, en solution chloroformique à 10 % en poids sont déposés sur la colonne de Sephadex G 25 soigneusement préparée, et l'élution se fait successivement avec les systèmes de solvants suivants:

1° Chloroforme/Méthanol 19/1 (v/v), saturé par 5 ml d'eau par litre de solvant ——→ fraction F_1

2° Chloroforme/Méthanol 19/1 (v/v) saturé par 5 ml d'eau par litre de solvant (5v) + 1v d'acide acétique pur (P A) ——→ fraction F_2

3° Chloroforme/Méthanol 9/1 saturé par 5 ml d'eau par litre de solvant (5v) + 1v d'acide acétique pur (P A) ——→ fraction F_3

L'analyse sommaire de ces trois éluats montre que:

a) F_1 contient la quasi totalité des lipides totaux

b) F_2 contient une petite quantité de sulfolipides et environ 20 % des glycolipides totaux. Ces derniers sont relativement polaires et ne sont élués de la colonne qu'avec le système de solvant S_2 contenant de l'acide acétique. Les substances non lipidiques sont éluées dans cette fraction F_2. On y trouve des phosphates organiques en grande quantité.

c) F_3 contient surtout des sels minéraux et certains sulfates organiques non lipidiques dont la quasi totalité se retrouve dans cette fraction fortement polaire et ionique.

La recuperation des sulfo et glycolipides élués dans F_2 peut se faire subséquemment par l'emploi d'une deuxième colonne plus petite de Sephadex G 25 type très fin. Le solvant est identique à celui utilisé pour obtenir F_2. La teneur en acide acétique est toutefois diminuée de moitié pour rendre le solvant moins ionique et ainsi favoriser la séparation des sulfo et glycolipides résiduels du reste de l'éluat. Ces sulfo et glycolipides récupérés (environ 10 % des lipides polaires totaux) seront mélangés avec les autres lipides de la fraction F_1.

II - 3. Préfractionnement des lipides neutres et des lipides polaires totaux

La fraction F_1 obtenue précédemment contient les lipides totaux purifiés de tous les contaminants non lipidiques. Elle sera soumise au fractionnement préalable des lipides neutres totaux et des lipides polaires totaux, séparément. Ce préfractionnement est indispensable et conditionne une bonne séparation des différents lipides polaires. On peut employer indifféremment soit une colonne de Silice 100 Mesh soit une colonne de DEAE cellulose. Les résultats sont equivalents à peu de chose près. Les lipides totaux, en solution à 10 % en poids dans le chloroforme, sont déposés sur la colonne préparée convenablement suivant la technique préconisée (8-9_10). L'élution des différents lipides se fait successivement par les systèmes de solvant suivants:

1° Chloroforme pur (PA) redistillé au préalable ------> f_1

2° Acétone pur (PA) ------> f_2

3 Chloroforme/Méthanol avec gradient concave de concentration en methanol par rapport au chloroforme → f_3

4° Méthanol pur (PA) ——————————————————— f_4

L'analyse sommaire par chromatographie sur couches minces de silice/silicate de magnesium bidimensionnelle, permet déterminer les constituants présents dans, chacune des fractions et éventuellement de tester la pureté des produits isolés. La répartition dans les différentes fractions est la suivante:

a) Ene f_1 tous les lipides neutres migrent massivement pour 90 %. On y trouve toutefois 1-2 % de lipides polaires totaux. Ceux-ci sont tres peu polaires et non ioniques. Leur élimination totale de f_1 relativement facile, ne pose aucun problème.

b) La fraction f_2 contient des constituants acétonosolubles très polaires, fortement ioniques et hygroscopiques.

c) Les fractions f_3 et f_4 contiennent la quasi totalité des phospho-et glycolipides totaux. Ces derniers sont plus ou moins polaires, ioniques ou non ioniques. On y trouve aussi une faible quantité de sulfolipides de faible polarité, qui, dans les fractions de queue de f_4 en général, MIGRE sans interférence avec les autres lipides polaires.

L'ensemble des lipides recueillis, totalisant les quatre fractions constitue jusqu'à 90-95 % des lipides totaux, utilisés au départ, si la colonne est parfaitement préparée. Le gradient concave de polarité est utilisé ici dans le seul but de faciliter les migrations des differentes classes lipidiques et de permettre la récupération quasi totale et plus aisée des divers constituants.

II - 4. Fractionnement des lipides polaires en classes individuelles.

Les lipides polaires des sous-fractions f_2,f_3,f_4, sont ensuite séparé s individuellement par fractionnement sur une deuxième colonne de Silice MALLINCKRODT 200 Mesh. La colonne double est utilisée ici aussi, et la préparation se fait de la même façon que précédemment.

A - Séparation des constituants de f_2

La fraction f_2 contient la quasi totalité des lipides polaires soufrés et 1-2 % environ des phospholipides. Après concentration, sous vide, les phospholipides sont

éliminés par précipitation dans l'acétone et la solution acétonique est ensuite passée sur une colonne d'Amberlite MB3 dans l'éthanol à 95 %. Les sulfolipides purifiés, en solution chloroformique à 10 % en poids, sont ensuite déposés sur une colonne de Florisil de 13,5 X 2 cm et élués progressivement par le système de solvant chloroforme/méthanol avec gradient linéaire de concentration en méthanol dans le chloroforme. Les solvants employés contiennent en outre 5 % de diméthyloxypropane comme agent desséchant. Les éluats sont collectés par fractions de 5 ml. Après évaporation, sous vide et séchage à 60°C, les pigments polaires sont éliminés par dissolution de l'éluat dans l'éthanol absolu (1-2 cc) puis précipités par 20 v de diéthyl éther anhydre deux à trois fois de suite jusqu'à ce qu'il n'en reste plus trace. La repurification par chromatographie sur couches minces preparatives des différents sulfolipides doit se faire au préalable avant toute étude structurale.

B - Séparations des lipides polaires individuels des fractions f_3+ f_4

Les fractions f_3 +f_4 contiennent divers lipides polaires qui peuvent être séparés sélectivement par chromatographie sur colonne SiO_2 avec un système de solvant à gradient lineaire de concentration en méthanol dans le chloroforme. Passés d'abord sur célite pour enlever les dernières traces des cations qui souillent les fractions. Les lipides sont ensuite lavés sur la colonne même, par du chloroforme redistillé au prealable (KOH) afin d'éliminer les traces de lipides neutres résiduels. Les lipides soufres résiduels sont ensuite élues par lavages répétés de la colonne par l'acétone. Après ces stades de purification primaire, menés aussi loin que possible, les lipides polaires individuels pourront être séparés par élutions progressives. Pour cela un système de solvants à gradient linéaire de concentration en méthanol par rapport au chloroforme est employé. Les éluats sont recueillis par fractions de 10 ml. Une aliquote de chacune de ces fractions est prelevée évaporée à sec et analysée

sommairement par chromatographie sur couches afen de contrôler la pureté des produits isolés.

II - 5. Purifications des lipides polaires isolés

Les différentes fractions collectées ne sont pas parfaitement pures. Pour une étude structurale valable des différents constituants il est nécessaire de les purifier à nouveau. La difficulté majeure dans cette tâche est d'établir des critères de pureté, indiscutables, sur lesquels repose la definition d'une substance pure. Par ailleurs la fragilité extrême de la plupart des lipides polaires, complique davantage la préparation des espèces chimiques d'un mélange complexe, dont certaines sont ici des substances inconnues. Pour l'estimation du dégré de pureté des substances lipidiques isolées nous avons adopté les critères de base suivants, ainsi seront considérées comme pures toutes les substances répondant à trois au moins de ces critères.

Premier critère

Par chromatographies: sur couche mince analytique unie et bidimensionnelle, ou sur papier-ascendante ou descendante-la fraction séparée ne donne qu'une seule tâche et celà quelque soit le solvant utilisé et sa polarité. La chromatographie descendante sur papier est très efficace dans bien des cas, les migrations sont rapides et la séparation des constituants de polarités très voisines est souvent meilleure que la chromatographie ascendante dans les mêmes conditions analytiques.

Deuxième critère

L'analyse élémentaire du produit isolé doit donner des résultats reproductibles, qualitativement et quantitativement quelque soit la technique analytique employée. Ce critère est à la base même de l'etablissement de la formule brute de l'espèce chimique considérée, que l'on peut exploiter largement.

Troisième critère

Dans une espece chimique pure les proportions relatives des différents éléments entre eux donnent un rapport constant. Dans la mesure où l'un des éléments minori -

taires représente l'unité, son rapport avec les autres éléments définit le nombred'atomes de l'élément considéré contenu dans la molécule. Il suffit dans ce cas de doser quantitativement l'element unitaire par plusieurs méthodes simultanément. Si la teneur de cet élément étalon ne varie pas quelle que soit la méthode analytique employée, l'échantillon peut être considéré comme suffisamment pur.

Quatrième critère

Les dosages qualitatifs et quantitatifs des différents constituants moléculaires peuvent aussi donner des renseignements précieux pour définir la purete de la substance isolée. Si la présence d'un des constituants isolés est démontrée et s'il peut être reconnu comme unitaire, la proportion de ce constituant, par rapport aux autres, reste invariable quelque soit la méthode analytique utilisee. Ces rapports constants définissent aussi la pureté de la substance considérée.

Cinquième critère

A défaut des constituants moleculaires connus on peut recourir aussi aux divers groupements fonctionnels caractéristiques de la molécule étudiée. Le dosage quantitatif de ces groupements fonctionnels peut aussi renseigner utilement sur le degré de purete de la fraction séparée.

Sixième critère

La determination des poids moléculaires par differentes méthodes physicochimiques tels que la spectrométrie de masse, l'ultracentrifugation, la vitesse de sédimentation et de diffusion, la mesure de la viscosité relative etc... fournissent aussi des précisions sur la pureté de la fraction séparée. Certes toutes ces techniques nécessitent des installations et des appareillage appropriés souvent très côuteux.....

Il est évident qu'aucun de ces critères n'est absolu, mais si une substance donnée répond positivement à trois au moins de ces critères, elle sera considérée comme suffisamment pure et les résultats des études structurales seront valables.

La chromatographie, sur couches minces préparatives de sillicagel/silicate de magnésium, combinéesaux chromatographies sur colonnes de silice MALLINCKRODT 100 et 200 Mesh ou de DEAE Cellulose, soigneusement élaborées nous ont permis d'isoler plusieurs lipides polaires individuels dont la pureté atteint le taux de 90 %, parfois plus. Toutefois la chromatographie sur couche mince préparative est assez difficile à réaliser correctement. D'abord les couches minces de sillicagel/silicate de magnésium doivent être preparées sans liant sulfate de Calcium , les couches sonr alors très friables. De plus l'épaisseur de ces couches ne doit pas être inférieure à 0,25 mm,afin que les quantitésséparées récupérables soient suffisantes. Or au delà de 0,30 mm d'épaisseur les plaques deviennent fragiles d'emploi peu commode. Enfin les solvants d'elution doivent donner une très bonne résolution. Plusieurs systèmes de solvants ont été conseillés par de nombreux auteurs. Pour notre travail nous nous sommes limités aux deux systèmes suivants, qui peuvebt être employés efficacement pour les développements unis et bidimensionnels. Le système S_1 est un mélange de chloroforme/méthanol/eau 65/25/4 (v/v/v). Ce système permet la séparation assez nette des lipides moyennement polaires. Le système S_2, composé de n-Butanol/acide acétique/eau 60/20/20 (v/v/v), est très polaire. Il permet une migration relativement haute des lipides fortement polaires.

Afin de limiter les degradations des lipides polaires thermodégradables et photolabiles les développements se font à 0°C, en chambre froide, à l'abri de la lumière.

II - 6. Déterminations des structures des différents lipides polaires

Les lipides polaires isolés et purifiés convenablement sont ensuite analysés chimiquement pour leur détermination structurale. Nous avons pour cela, procédé à l'analyse et au dosage des éléments et des constituants moléculaires de chacun des lipides polaires isolés.

II - 6.1. Analyses et dosages élémentaires

L'analyse élémentaire permet avant tout d'établir sommairement les formules brutes des lipides polaires trouves. Les méthodes analytiques sont nombreuses et plus ou moins efficaces.

L'inconvénient est qu'une quantité relativement grande est souvent nécessaire pour faire une analyse rationnelle. Or dans le meilleur des cas les fractions obtenues par chromatographies sur colonnes se révèlent souvent quantitativement insuffisantes. Des techniques de microdosages adéquates ont été éléborees à cette fin. Concernant: le soufre, le phosphore et l'azote les dosages ont été effectués simultanément par le service de microanalyse du CNRS de Thiais et par nous mêmes selon les techniques suivantes.

II- 6.1. - Dosage du Soufre

Le soufre de certaines fractions obtenues fait partie intégrante de la molécule lipidique, sous forme d'esters sulfates ou sulfonates. La teneur en soufre des différents sulfolipides des algues est relativement faible et le dosage de cet élément est d'autant plus ardu que l'on dispose ici de faibles quantités de matériels. En outre le soufre est assez volatile et les pertes ne sont pas négligeables si aucune précaution préalable n'a été prise au cours de l'hydrolyse oxydative qui précède son dosage. Notons que certains auteurs préconisent des méthodes de caractèrisation du soufre sans hydrolyse au préalable (11-12-13), mais les résultats obtenus souvent contradictoires, ne permettent donc pas d'établir un rapport rationnel des proportions avec les autres éléments constitutifs de la molécule. Par ailleurs les sulfonates sont très difficiles à atteindre par les méthodes classiques d'hydrolyse. Les dosages par étapes sont souvent nécessaires afin de limiter les erreurs.

Nous avons expérimenté successivement un grand nombre de techniques, qui ont fait leurs preuves, mais pour notre travail nous ne retenons que deux d'entre elles, car elles sont simples, efficaces et facilement adaptables à un travail exhaustif

.- La première technique consiste à faire une hydrolyse oxydative des lipides, en microtubes scellés, en presence de NO_3H/ CIH/ NACI, à 180°C pendant 24 h au moins et les soufres libérés au fur et à mesure sous formes de $S, SH, SH_2, S_2O_3, SO_2, SO_3$, sont immédiatement pris en charge par NaCL et progressivement transformés en SO_4. Les pertes des corps volatiles sont ainsi évitées, la récupération du soufre est quasi-totale. Le dosage se fait ensuite par la méthode au chloranilate de Baryum au spectrophotomètre à 327 nm.

.- La deuxième méthode que nous employons dérive de la technique de LONG et STAPPLES (14-15-16) modifiée par JONES et LETHAM (17-18) dite méthode à la benzidine. Cette méthode permet une estimation très reproductible, lorsque le soufre est en très faible quantité dans le materiel ce qui est le cas de nos lipides polaires isolés. La methode n'est toutefois applicable qu'aux sulfates, les sulfonates ne sont pas dosés par cette methode de LONG et STAPPLES sans modifications appropriées, surtout si d'autres lipides sont presents dans les extraits, même en faibles quantités. Dans ce cas les sulfolipides deviennent plus résistants à l'hydrolyse et le taux des sulfates libérés est faible par rapport à la teneur réelle du soufre présent. De même les sulfites ne sont pas dosés entièrement par la méthode à la benzine. Par contre les SH des lipoprotéines présents, même en faible quantité, peuvent interférer et les résultéts sont indubitablement faussés. Afin d'utiliser éfficacement cette technique nous avons dû la modifier assez profondément.

La première étape de la modification consiste à améliorer la méthode d'hydrolyse oxydative afin que le soufre, sous toutes ses formes, puisse être oxydé progressivement en sulfates. Nous employons donc la méthode d'hydrolyse oxydative préconisée dans la technique analytique (ci-dessus) . Nous avons pris soin avant l'hydrolyse de bloquer irréversiblement les groupements SH lipoprotidiques par le chorure de mercure et de les éliminer de l'extrait hydrolysé. La deuxième modification consiste à sensibiliser le dosage quantitatif en le simplifiant le plus possible Nous avons donc utilise, de préference, la méthode titrimétrique différentielle, après précipitation du sulfate par le benzidine. Le dosage par titrimétrie a l'avantage d'être très rapide et nous évite avant tout l'étalonnage que nécessite toute méthode spectophotométrique. L'efficacite de cette méthode est comparable à celle de la méthode au chloranilate. Les résultats sont par ailleurs reproductibles.

L'emploi simultané de ces deux techniques nous a donné des renseignements complémentaires très précieux, réduisant largement les imprécisions lors de l'interprétation des résultats obtenus. Du point de vue de l'étude structurale, essentielle pour nous, il est bien évident que la détermination exacte de la teneur en soufre

dans les différents sulfolipides est primordiale et conditionne tous nos résultats à venir.

II - 6.1.1 . Etats du soufre dans les molécules des sulfolipides

L'expression des resultats de l'hydrolyse oxydative des sulfolipides a conduit aux remarques suivantes:

Première remarque

L'hydrolyse totale des sulfolipides nécessite 24-48 h à 180°C et en présence d'eau regale/ClNa, préparé extemporanèment. L'eau régale préparée la veille est très peu efficace. L'absence du ClNa, dans le mélange, réduit le taux de sulfate libere de 30 % environ, ce qui est loin d'être négligeable.

Deuxième remarque

L'étude cinétique des sulfates libérés montre qu'une partie de ces sulfates est liberée totalement en 16-18 h. Environ 38 à 46 % des sulfates lipidiques font partie de ce groupe. Faisant suite à ce groupe, environ 40 % d'un deuxième contingent de sulfates est libéré après 30 à 50 heures d'hydrolyse continue (voir courbrs 1a/b pages 23 24). Ce deuxieme lot de sulfates n'est pas facile à obtenir et sera perdu si des conditions spéciales n'ont pas été observées. Par exemple en l'absence du ClNa dans l'eau régale en quantite suffisante, le taux de sulfate dosé est très amoindri par rapport au taux réel . Néanmoins dans ces conditions analytiques la présence des phosphates, même en petite quantité, peu interférer par formation de précipités insolubles avec la benzidine.

Compte tenu de ces observations nous pouvons conclure avec une quasi certitude que le soufre présent dans les sulfolipides des Fucacées étudiées est sous forme de sulfates et de sulfonates. Les Premiers sont relativement faciles à hydrolyser tandis que les seconds necessitent, pour être libérés, une action plus longue et plus conséquente.

Notons encore qu'en presence d'un excès de cyanure et d'ions cuivriques, la conversion des sulfonates en sulfates est totale. Mais la présence du cuivre peut perturber la détermination colorimétrique des sulfates par la méthode au chloranilate de baryum, et doit être exclue dans ce cas précis de dosage.

II- 6.1.2. Dosages du phosphore

Le phosphore, comme le soufre, fait partie intégrante des phospholipides sous forme d'esters phosphates des glycérides. Les méthodes de dosage du phosphore sont nombreuses et donnent toutes des résultats comparables.(19-21). Néanmoins le phosphore lipidique est présent mais en faible quantité dans les phospholipides des algues marines, les méthodes classiques de dosage se révèlent alors souvent peu efficaces pour ces faibles teneurs et les résultats , qui ne sont pas toujours reproductibles sont difficilement interprétables.

En outre, la présence du magnésium même à l'état de trace peut perturber considérablement ces dosages. Pour ces diverses raisons, l'hydrolyse des phospholipides est plus compliquée que celle des sulfolipides et des glycolipides. Tout d'abord on remarque que les conditions d'hydrolyse d'un mélange de phospholipides ne sont pas les mêmes que celles d'un phosphatide seul à l'état pur. En second lieu tous les lipides phosphorés ne sont pas hydrolysables dans les mêmes conditions. Les glycérophospholipides par exemple sont très aisément hydrolysés sous l'action d'acide et d'alcali dilués à température ambiante. Pour les inositides, par contre, il faut chauffer longtemps en présence d'acides forts ou d'alcalis concentrés et leur hydrolyse n'est pas totale. Ceci s'explique en partie par le fait que les diverses liaisons dans une molécule lipidique sont plus ou moins faciles à détacher. L'acide glycérophosphorique est de ce fait difficile à hydrolyser tandis que les acides gras constitutifs sont détachés par les alcalis à température ambiante. Il faut signaler enfin que les alcalis agissent plus doucement que les acides., mais certaines liaisons telles que les liaisons acétals, hémiacétal-éther.... ne sont pas rompues par / les agents alcalins alors que les acides les coupent totalement, sans difficulté.

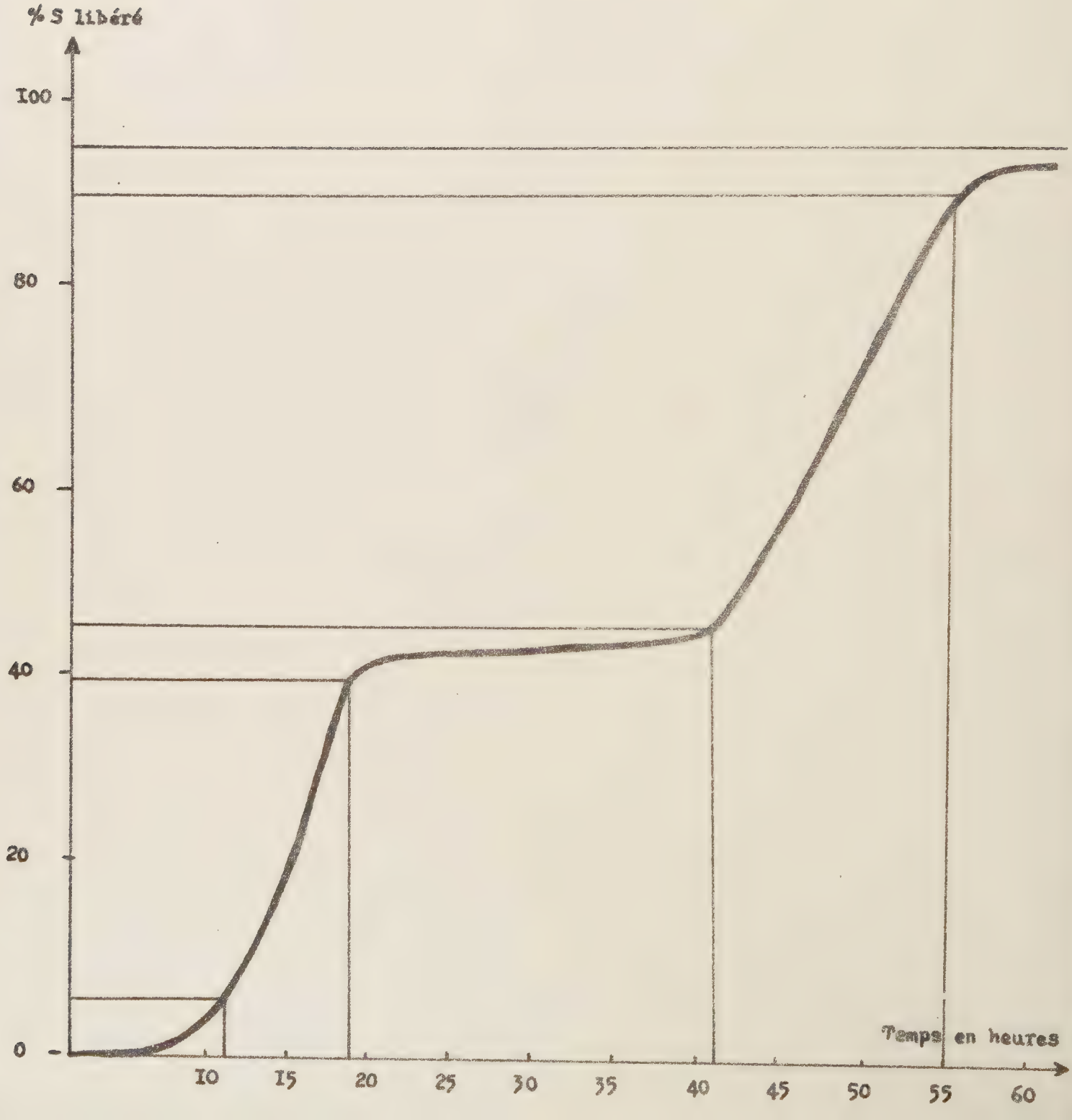
En ce qui concerne les phospholipides, nous pouvons les répartir dans les trois groupes suivants.

- Dans le premier groupe nous y classons tous les alcalidégradables à savoir : les phosphatidyl-choline -éthanolamine -sérine -glycérol -inositol, acide phosphatidique et diphosphatidylglycérol. Ces différents phosphatides peuvent être hydrolysés par par l'hydroxyde de sodium dans l'éthanol à 0,05 N

COURBE I

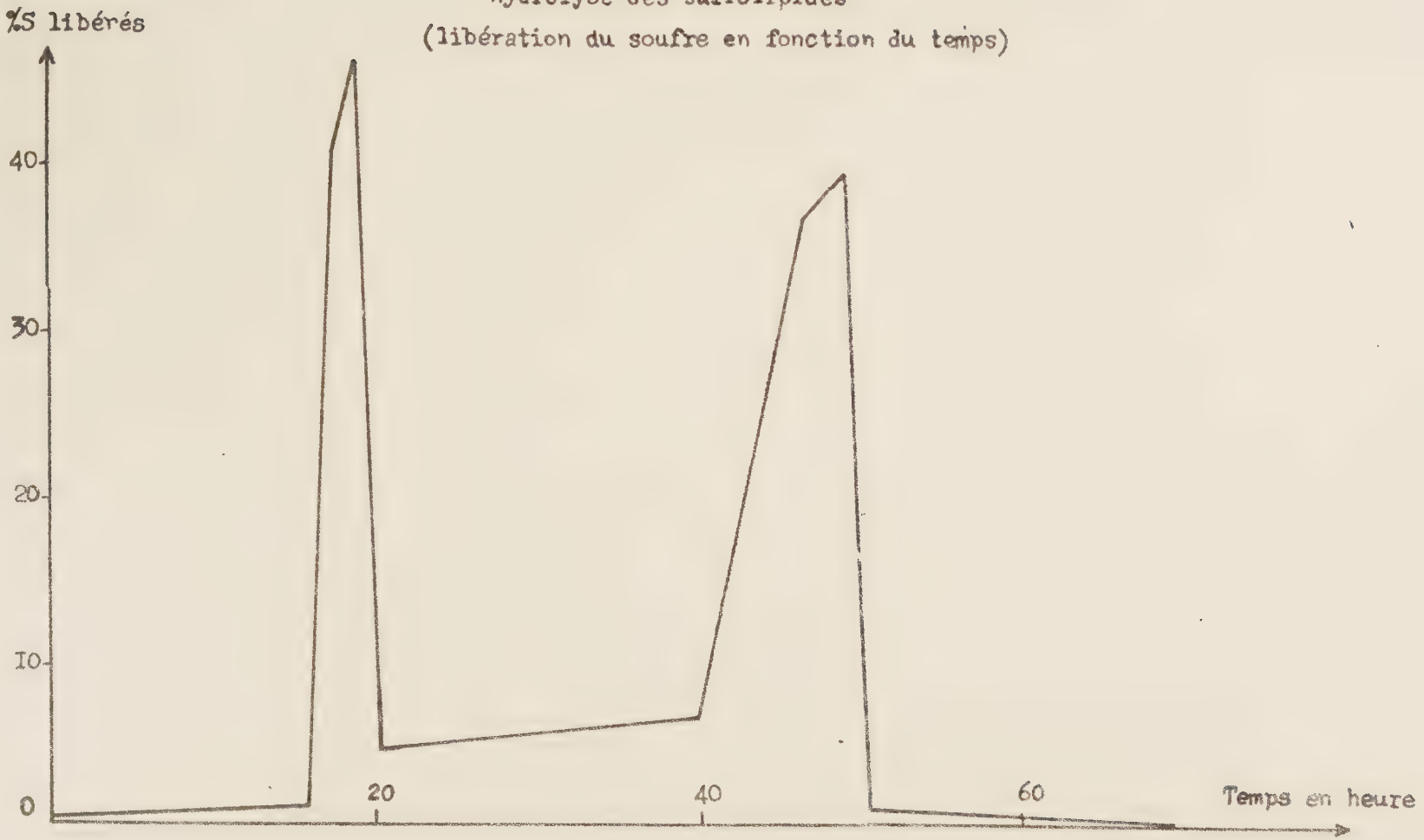
Cinétique d'hydrolyse des sulfolipides.

Taux de sulfates libérés en fonction du temps



COURBE I B

Hydrolyse des sulfolipides
(libération du soufre en fonction du temps)



- Dans le deuxième groupe nous rangeons les plasmalogènes alcalistables. Ils sont dégradés par les acides, même par action menagée

- Le troisième groupe englobe les phospholipides stables à l'égard des bases et des acides. On compte parmi ce groupe les spnongomyélines qui sont hydrolysées seulement en tube scellé en présence du ClH/méthanol 2N pendant 4h à 100°C. Nous avons donc ici adopté une méthode d'hydrolyse ménagée en trois étapes. Les fractions hydrosolubles obtenues contiennent de l'acide phosphorique si l'hydrolyse est totale. Si l'hydrolyse est méNagee nous obtiendrons surtout, comme produits hydrosolubles, des composés complexes parmi lesquels les glycérophosphates. La chromatographie sur papier ou sur couches minces permet de séparer les acides glycérophosphoriques des autres composés hydrosolubles de l'hydrolysat.

On caractérise alors les glycérophosphoryls esters; le phosphore est subséquemment dosé après avoir scindé la molécule par le mélange hitroperchlorique. L'acide phosphorique libéré, transformé en acide phosphomolybdique , est alors réduit par l'acide 1 amino 2 naphtol 4 sulfonique, et dosé par colorimétrie en lulière rouge. Cette méthode permet de doser environ 5 à 20 microgrammes de phosphore avec une précision tres grande.

II - 6.1.3. Dosages de l'azote

L'azote est le troisième élément présent dans certains lipides polaires, tels que les phosphatidyl-choline-éthanolamine-sérine, les sphingomyélines et les cérébrosides etc.... L'azote y est lié soit: par des liaisons amides avec les acides gras, par des liaisons esters avec l'acide phosphorique, ou encore par des liaisons éthers avec les oses dans les cérébrosides par exemple. Dans le cas des lipides algaux la presence de pigments polaires, qui accompagnent les lipides dans chaque fraction, sont difficiles à éliminer totalement au risque d'abimer les lipides eux-mêmes. Ceci pose donc des difficultés sérieuses lors du dosage de l'azote. Il faut donc doser les différents phospholipides dans une première étape après hydrolyse ménagee, tout en ayant soin d'éliminer au préalable les substances azotees non lipidiques.

Le dosage de l'azote de ces différents phospholipides séparés se fait ensuite par volumétrie selon la technique de KJELDAHL (22)

Les différents résultats que nous avons obtenus après dosages du soufre, du phosphore et de l'azote, selon les méthodes préconisées, se révèlent parfaitement concordants. Par rapport aux chiffres fournis par le service de microanalyse de Thiais, la différence est infime pour le soufre et le phosphore Les valeurs se correspondent à 5 % près pour une trentaine d'échantillons dosés parallèlement par nous et par le service de microanalyse. En ce qui concerne le dosage de l'azote, les écarts des valeurs obtenues dans les deux laboratoires sont assez importants sans être inconsidérés. En effet les résultats obtenus par le service de microanalyse sont de 10 à 15 % supérieurs aux nôtres.

Il faut toutefois signaler que les dosages que nous avons fait portent sur des substances entièrement débarrassées des chlorophylles et des substances azotées non lipidiques. Ceux effectués par le service de microanalyse contenaient encore des pigments polaires résiduels. Nous les y avions laissés afin d'éviter les détériorations des produits avant analyse.

II - 6.1.4. Dosages du Carbone, de l'oxygène et de l'hydrogène

Les dosages de ces éléments ont été effectués par le service de microanalyse de Thiais sur autoanalyseur "Technicon". Nousn nous sommes assurés toutefois de la reproductibilité de ces r résultats.

II - 6.2. Analyses et dosages des constituants moléculaires dans les fractions séparées.

Les propriétés physicochimiques qui différencient les lipides polaires, en particulier: la migration séléctive sur colonnes chromatographiques par des solvants à polarités croissantes donnent des renseignements sur la nature probable du groupe lipidique auquel appartient la substance séparée. On ne peut donc se contenter de quelques analyses rapides, car l'identification des lipides polaires n'est pas chose simple, la plpart d'entre eux sont encore inconnus et leur diversité est grande. En voici un exemple: Les lécithines de compositions en acides gras tres différentes peuvent avoir toutes des propriétés physice chimiques très voisines. Leurs migrations sur les colonnes et sur couches minces ne

sont nullement gênées par les phénomènes d'entrainement ou de rétention réciproque ce qui n'est pas toujours le cas pour les autres groupes de lipides polaires entre eux. Ces différentes lécithines peuvent migrer ensemble et réagissent de la même façon à l'égard des différents réactifs servant à les caractériser plus ou moins spécifiquement. La recherche et le dosage des constituants lipidiques permettent de confirmer ou d'infirmer la présence de certains types ou groupes specifiques de lipides.

La formule brute établie par analyse élémentaire ne permet pas de caractériser un lipide moins encore de l'identifier, mais elle est indispensable aux études de structure des lipides inconnus. La méthode d'analyse et de dosage des constituants moléculaires que nous utilisons consiste à hydrolyser dans la première étape les lipides soit en milieu acide soit en milieu alcalin. On sépare ensuite les trois catégories principales de substances dans l'hydrolysat :

1° les acides gras, hydrosolubles en milieu alcalin, insolubles en milieu acide. Ils sont extraits par l'éther de pétrole. Après acidification du milieu les acides gras sont méthylés et analysés.

2° les insaponifiables: insolubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques.

3° les substances hydrosolubles enfin et qui sont: les glycérols, l'acide phosphorique, les sulfates, les sulfonates, les oses, les bases azotées et les acides aminés.

La méthode d'hydrolyse en milieu acide ou basique (cf § précedent) donne dans l'ensemble de bons résultats. Néanmoins certains lipides sont réfractaires et les hydrolyses repétées sont souvent indispensables, pour atteindre les lipides polaires présents en totalité. Toutefois il faut éviter les oxydations et les polymérisations qui peuvent se produire en cours d'études.(usages des antioxydants tels que: pyrogallol, ac. ascorbique, NDGA etc...)

Analyses et dosages

1°) des acides gras

Les acides gras sont caractérisés par déterminations simultanées de leur poid moléculaire, de leur indice d'iode et de leur indice d'acétyle. Ces deux indices indiquent le degré

d'insaturation et le nombre de fonctions hydroxyles.

1) Détermination du poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire des acides gras se fait par la méthode volumétrique en milieu alcoolique et en présence d'indicateur coloré. Cette méthode est très approximative, les causes d'erreur peuvent être nombreuses si des précautions particulières n'ont pas été prises. Cependant cette méthode de détermination du poids moléculaire des acides gras fournit des renseignements très utiles et elle a l'avantage d'être simple et rapide. Le poids moléculaire est calculé par rapport à celui de l'étalon utilisé selon la formule:

$$PM = 258 \times \frac{P}{P'} \times \frac{N'-e}{N-e}$$ (258 = PM de l'acide palmitique)

(P= poids de l'échantillon prélevé

P'= poids de létalon employé

N et N'= Volumes de KOH utilisés pour neutraliser l'acidité de l'échantillon et de l'étalon).

2) Mesure de l'indice d'iode

La mesure de l'indice d'iode est faite suivant la méthode de YASUDA modifiée (23) par le sulfate de dibromopyridine. Après fixation de l'halogène sur les doubles liaisons on titre par retour l'excès du reactif non consommé. Cette méthode, comme toutes les autres méthodes de mesure d'indice, n'est pas parfaite, mais elle donne des résultats reproductibles et des valeurs plus précises que les méthodes classiques connues. L'hydrogénation subséquente en présence d'oxyde de platine, comme catalyseur, permet de compléter les résultats obtenus par la mesure de l'indice d'iode.

3) Mesure de l'indice d'acétyle

Les fonctions OH des acides gras, d'alcools gras, d'oses etc.... peuvent être dosées par cette méthode. Malheureusement les fonctions amines libres sont aussi dosées par ce procéde. La méthode de DESNUELLE (24) par l'anhydride acétique en milieu pyridinique donne des résultats satisfaisants.

4) Séparation et dosage des acides gras

Les techniques de séparation, d'identification des acides gras sont nombreuses. Elles sont toutes basées sur la difference de solubilités des acides saturés et insaturés dans un solvant considéré.

Les chromatographies sur papier imprégné au silicone et à la paraffine lipophile donnent de bons résultats. Le solvant utilisé est, dans ce cas, l'acide acétique/eau 95/5 (v/v) ou alcool/eau 98/2 (v/v).

La chromatographie sur couches minces de silice est aussi efficace. Les plaques impregnées au nitrate d'argent permettent de séparer les acides gras insaturés (mono-di-et poly...) des acides saturés.

La chromatographie en phase gazeuse utilisée de préférence pour notre étude permet d'analyser les acides gras qualitativement et quantitativement avec grande precision. Après méthylation, les esters méthyliques obtenus sont séparés sur colonne polaire (DEGS) ou apolaire (S.E.30 ou APIEZON L) (25).

2°) Dosage du glycérol

L'hydrolyse totale des lipides libère le glycérol. Les méthodes de caractérisation sont diverses et spécifiques. Les lipides polaires et les phospholipides libèrent des glycérophosphoryls ou l'acide glycérophosphorique.

La caractérisation et le dosage du glycérol libre par la méthode de DENIGES (26)-oxydation par l'eau de brome en présence d'acide sulfurique concentré- est l'une des methodes utilisées. Le méthylglyoxal obtenu, donne avec la codéine une coloration vert canard intense, très caractéristique, dosée spectrophotométriquement.

La méthode au périodate est aussi une methode de choix, et qui donne des résultats assez précis. L'acide périodique en excès peut être titré en retour, en présence d'iodure de potassium qui libère l'iode du périodate non consomme. Le dosage du formol après réduction par l'acide chromotropique se fait facilement par colorimétrie.

Si l'acide glycérophosphorique est libéré seul dans l'hydrolysat, l'hydrolyse des phosphatides n'est donc pas totale, et

rend le dosage plus complexe. L'isomérisation dans ce cas est fréquente, et la présence d'isomètres α et β ne simplifie pas le problème. Il est alors nécessaire de transformer la forme β en sa forme α par ébullition pendant 15' environ en présence d'acide sulfurique (27). Les acides glycérophosphoriques sont très stables. En présence d'acides ou d'alcalis leur hydrolyse est inhibée; mais ils peuvent être décomposés, en solution aqueuse, à l'autoclave à 150°C durant deux heures. (28-29). Le passage sur Amberlite IR 100 H + les libèrent de leurs sels. Les acides α glycérophosphoriques sont dosés par la méthode de BURMASTER (30-31) à pH 1,5 après traitement par l'acide périodique. Les phosphates de l'aldéhyde glycolique formé libèrent de l'acide phosphorique par hydrolyse acide en milieu sulfurique à 100°C pendant une heure. Cet acide est dosé selon la méthode au molybdate d'ammonium, et au spectrophotométre à 650 nm.

3°) Dosage de la choline

La choline présente dans la lécithine et les spningomyélines peut être libérée, de ces complexes, soit par hydrolyse alcaline soit par hydrolyse acide en présence de méthanol chlorhydrique 5 N. La choline libérée est alors dosée par la méthode de HANDLER (32-33) à pH 9,0. Les sels de Reineckate formés sont dosés spectrophotométriquement en lumiere verte. Cette méthode nécessite une quantité plus ou moins grande de choline. Pour de faibles teneurs l'extrapolation des resultats entraine des erreurs de résultats non négligeables. La méthode de APPLETON (34) est préférable, elle dose la choline sous forme de périodure par spectrophotométrie en lumière ultra violette à 635 nm. Environ 5 à 10 microgrammes de choline sont dosables par cette méthode à 6 % d'erreur près.

4°) Dosage de l'éthanolamine et de la sérine

La sérine et l'éthanolamine présentes dans les phosphatidylserine et éthanolamine peuvent être libérées par méthanolyse en milieu chlorhydrique. Toutefois l'élimination préalable et soignée de tous les autres acides aminés en tant qu'impuretés est de rigueur. Les composés aminés sont liés aux phosphatides par des liaisons solides, difficiles à éliminer. Leur dosage se fait suivant la méthode d'AXELROD (35) après obtention des dérivées

colorés par action du dinitroflurobenzène. La séparation des dérivés de la sérine et de l'éthanolamine se fait sans difficulté à l'aide du chloroforme en milieu acide. Les dérivés de la sérine sont ensuite élués par le methylisobutylcétone. La chromatographie descendante sur papier par le mélange n-butanol/diéthylèneglycol/eau 4/1/1 (v/V/V) donne un meilleur résultat, la révélation se fait à la ninhydrine. L'autoanalyseur "Technicon", d'utilisation plus recente, permet ces dosages avec efficacité, mais cette méthode n'est rentable qu'à grande echelle.

Les methodes que nous avons employées, ci-dessus mentionnees, permettent de doser 10-20 microgrammes de substance avec une précision de l'ordre de 2 %-6 %

5°) Dosage de la sphingosine

Les cérébrosides et les sphingomyelines contiennent de la sphingosine. Ces substances, fortement liées dans les lipides, sont libérées difficilement. A cette fin nous employons l'hydrolyse prolongée en milieu acide et les résultats sont souvent satisfaisants. En cas contraire nous complétons l'hydrolyse acide par une hydrolyse alcaline. Dans ces conditions tous les types de liaisons sont rompus successivement et la sphingosine est entièrement libérée dans l'hydrolysat. Le dosage de la sphingosine isolée par extraction au chloroforme se fait par dosage de l'azote présent suivant la méthode de MC KIBBIN et TAYLOR (36-37). Les résultats sont valables si toutes les substances non lipidiques azotées sont éliminées préalablement.

6°) Dodage des aldéhydes gras

Les aldéhydes gras des plasmalogènes sont libérés par action des acides et sont dosés colorimétriquement à l'aide du réactif de Schiff. Sous la forme d'acétals ils sont alcalistables. Si on veut obtenir un dérive aldéhydique du glycérol à partir des plasmalogènes on soumet ces derniers à l'hydrolyse en milieu basiques. Dans ce cas les acides gras sont séparés et les résidus aldéhydiques du glycérol qui restent dans l'hydrolysat sont stables. La méthode de RAPPORT et ALONZO (38-39) par action de la fuschine bisulfitée donne une coloration stable, permettant un dosage colorimètrique valable. L'étalon de référence peut être un hémiacétal ou un aldehyde gras connu.

7°) Dosage de l'inositol

L'inositol est un hexalcool très stable. Les acides et les alcalis sont sans action sur les inositols. Par ClH 2 N à 100°C, pendant 48 à 56 heures, les inositides peuvent être hydrolyses en grande partie et l'inositol est libéré. La caractérisation de l'inositol peut se faire soit par cristallisation dans l'alcool à 90° à chaud soit par la réaction de SCHERER (40). Cette dernière donne avec l'acide rhodizonique et en presence de NO_3H une coloration rouge qui se développe intensément, donnant une fluorescence verte. Le dosage de l'inositol peut être mené par oxydation périodique, le CO_2 dégagé est mesuré au Warbourg. L'élimination des oses qui accompagnent souvent les inositols est obtenue par destruction en présence de la magnésie. La précision des résultats est de l'ordre de 70 %, pouvant atteindre 85 % parfois.

8°) Dosage des glucides

La plupart des sulfolipides et tous les glycolipides contiennent des un à quatre hexoses environ, rarement plus sauf exception. Si les renseignements concernant les glucides sont très nombreux, nous ne savons par contre que très peu de chose sur les sucres des glyco-et sulfolipides. Chez les algues brunes nous avons dénombré au moins cinq glycolipides connus et inconnus dans la nomenclature actuelle de sulfolipides dont certains contiennent des glucides. En raison de leur importance, la caractérisation des sucres des sulfo et glycolipides, ainsi que la nature de leurs liaisons doivent être établies de façon indiscutable. La première difficulté consiste à extraire et à purifier les glucides. L'hydrolyse acide ménagée souvent utilisée doit être adaptée suivant qu'elle concerne les glycolipides ou les sulfolipides. Les conditions optimales de l'hydrolyse acide varient substantiellement suivant la stabilité des liaisons glycosidiques impliquées. Ainsi les unités glucidiques externes sont hydrolysées facilement; elles sont labiles en milieu acide. Les acides sialiques éventuellementprésents sont hydrolysés très rapidement même en milieu très légèrement acide. Les fucoses sont aussi relativement faciles à hydrolyser. Afin d'atteindre tous les glucides nous avons procédé à l'hydrolyse graduelle en tube scellés par SO_4H_2 0,1 N à 100°C. Les prélèvements, à intervalles réguliers, permettent de

de déterminer la vitesse d'hydrolyse pour chaque sucre et d'établir la courbe cinétique, caractéristique de chacun d'eux. Les hydrolysats obtenus au cours des différents prélèvements sont passés sur colonne DOWEX 1X 200-400 mesh, couplée avec une deuxième colonne de DOWEX 50X 200-400 mesh. La première sous forme formate (COO^-), retient les ions sulfates en échange des formates. La deuxième colonne sous forme (H^+) absorbe les glucosamines, les acides aminés et les peptides si ces derniers sont présents. Les éluats et l'eau de lavage des colonnes contiennent des sucres neutres. Les hexosamines sont ensuite éluées de la colonne de DOWEX 50 X par ClH 2N. Les sucres obtenus sont en général assez purs. Une chromatographie quantitative sur papier permet d'atteindre un degré de pureté supérieur. Les sucres sont ensuite caractérisés par l'anthrone pour les hexoses et par la cystéine-acide sulfurique pour les fucoses et les oligosaccharides éventuellement présents dans l'hydrolysat. De petites quantités de peptides peuvent être présentes dans l'éluat, mais elles sont facilement éliminées par passage sur Célite/charbon végétal :1/1. Les hexosamines sont caractérisées par le réactif de MORGAN-ELSON selon la technique de E.F. ROSS (41) et J.L REISSIG et J.L STROMINGER (42-43-44).

Pour les sulfolipides, la dégradation partielle dans le méthanol chlorhydrique à 0,05 N pendant quatre heures à température ambiante, suivie d'une deuxième hydrolyse par ClH 0,3N en solution chloroforme/méthanol 2/1, donne des résultats très satisfaisants. La neutralisation par NaOH, entre deux hydrolyses, afin d'arrêter les réactions est indispensable. Les céramides des dihexosides et les glycérides hexosides sont secondairement hydrolysés dans la deuxième étape donnant des oses libres. L'analyse des sucres libérés se fait ensuite par chromatographies sur papiers ou sur couches minces. L'électrophorèse à haut voltage donne des résultats comparables,aux méthodes chromatographiques mais les inconvenients de l'hydrolyse acide sont multiples. Tout d'abord, en raison de leur diversité, les glucides glyco et sulfolipides ne peuvent être détachés par une hydrolyse ménagée, de façon complète. Certaines liaisons glycosidiques sont trop fortes pour être rompues dans ces conditions. Une hydrolyse trop forte risque de détruire la quasi totalité des sucres qui ne supportent pas l'action trop brutale d'un acide fort ou trop concentré. En outre, en présence des acides aminés, les glucides peuvent se condenser formant des produits secondaires difficiles à hydrolyser par la suite. Enfin l'hydrolysat doit être déféqué au préalable

pour éviter les caractérisations douteuses. L'acide trichloracétique 0,5 N, en quantité suffisante, est employé efficacement à cet effet. Cet acide précipite en général tous les produits secondaires provenant de l'hydrolyse des diverses substances organiques. L'acide phosphotungstique et l'acide phosphomolybdique employés par les auteurs anglo-saxons, gênent les dosages subséquents des glucides. Ils doivent être éliminés secondairement par précipitations au KCL. Le dosage des sucres isolés se fait par différentes méthodes dont les plus utilisées sont les suivantes :

-Première méthode.

Cette méthode dite au carbazol de GURIN et HOOD (45-46) est peu spécifique. Le carbazol réagit entre autres avec les acides aminés, quoique faiblement.

-Deuxième méthode.

La méthode à l'anthrone de MOKRASCH (47), est peu efficace car les intensités d'absorption varient avec les sucres, mêmes ceux de même catégorie.

-Troisième méthode.

La méthode à l'orcinol de SOERENSEN et HAUGAARD (48-49) est assez spécifique, elle est très sensible pour les pentoses. Les hexoses ne réagissent et n'interviennent pas dans le dosage, par cette méthode.

-Quatrième méthode.

La cystéine sulfurique de DISCHE (50-51) est spécifique des aldohexoses et de leurs dérivés.

-Cinquième méthode.

La méthode au résorcinol de SELIWANOFF (52-53) en milieu chlorhydri- spécifique des cétones hexoses. Le D fructose est encore dosable pour des quantités de l'ordre du microgramme.

-Sixième méthode.

La méthode au naphtorésorcinel en milieu chlorhydrique de TOLLENS (54-55) est surtout appliquée au dosage des acides uroniques. Elle reste sensible aux quantités de l'ordre de 50 microgrammes.

-Septième méthode.

La méthode au diméthylaminobenzaldéhyde, appelé réactif d'ERLICH; est la seule spécifique des acides neuraminiques ou sialiques mais malheureusement elle est très peu sensible.

Toutes ces méthodes sont simples et rapides mais comme pour tous les dosages de sucres par absorption spectrophotométrique, les déféca-

t'o

tions sont utiles, bien qu'elles ne soient pas indispensables. Les précisions ne sont pas toutefois rigoureuses.
Les méthodes chromatographiques sont très utilisées pour les dosages quantitatifs et qualitatifs des sucres, elles sont très efficaces. Les divers sucres, transformés en dérivés volatiles tels que: O- t' méthyléthers, O-acétylesters, O-triméthylsil yl ethers (TMS) etc... sont chromatographiés en phase vapeur sur colonne apolaire SE 30 à 10% sur chromosorb. Les séparations sont excellentes. Les dérivés non polaires étant moins réactifs que les dérivés polaires on emploie de préférence c ces derniers pour les dosages quantitatifs. Les pertes sont moins importantes et les dérivés TMS des glucides ont été utilisés avec succès dans toutes nos expériences. Nous avons donc préféré la méthode chromatographique à toutes les autres. La phase polaire qui peut être le polyéthylèneglycol est aussi utilisée pour séparer le mélange pentoses/hexoses. Elle donne de bons résultats et les renseignements fournis complètent ceux obtenus sur phase apolaire. L'emploi de standards internes permet un contrôle des résultats quantitatifs et augmente la marge de sécurité. Les dérivés sucres-phosphates et sucres-sulfates peuvent être dosés efficacément par chromatographie en phase vapeur, celle-ci dans ces cas précis et dans une certaine mesure supplée efficacément les chromatographies : sur papier, sur couches minces.

Oxydation périodique des glucides.

L'oxydation périodique des glucides après méthylation nous renseigne sur les modes de liaisons des sucres avec les lipides et autres constituants. Sur les sucres libres ou associés l'emploi du métapériodate de sodium en solution 0,0I-0,08 M dans le tampon acétate (0,05 M pH 4,5) pendant 40-80h permet, entre autres, de déterminer la nature des sucres et leur de mode de liaison. L'opération doit être menée à l'obscurité et les prélèvements pour analyses sont effectués toutes les quatre à cinq heures. Après chaque prélèvement les réactions doivent être stoppées par addition du glycoléthylène en excès. Après dialyse, dans NaCl à 0,I M, puis dans l'eau distillée en chambre froide, les produits oxydés sont analysés par la méthode à l'arsenic de FLEURY et LANGE (56-57). Le formaldéhyde formé par oxydation périodique ·nt ; aussi être déterminé après réduction du périodate par l'arsénic en présence d'acide chromotropique.

Déterminations des liaisons glucides O-sulfates et O-phosphates.

Les esters sulfates ou sulfonates des glucides sont des constituants moléculaires de certains sulfolipides. Pour déterminer le ou les carbones engagés dans les liaisons esters sulfates ou sulfonates, nous avons employé les techniques physicochimiques suivantes :

1° Vitesse d'hydrolyse en milieu acide.

Les sites de liaisond des groupes O-sulfates sont déterminables par la vitesse d'hydrolyse. Suivant les positions équatoriales ou axiales de l'hydroxyle primaire ou secondaire, les vitesses d'hydrolyse varient notablement. En présence de ClH à 0,25 M et à 100°C REES (58) a établi la demi-vie de 0,1 à 0,4 H/1 à 1, 30 H/ et supérieure à 1,30 h respectivement pour les trois modes de liaisons. Les incertitudes sont très grandes dès qu'il s'agit de calculer les demies-vies de plus de deux types de groupes sulfates esters présents dans la préparation. Cette méthode est surtout employée à titre complémentaire.

2° Spectre infra-rouge.

L'étude des sites des groupes de liaisons O-Sulfates montre des bandes d'absorption très intense à 1240 cm^{-1} attribuées aux vibrations de la liaison S-O commune à tous les sulfates. Les pics dans la région 800-860 cm^{-1} est caractéristique des 6-Sulfates esters des sucres de conformation C_1 (D). Le pic à 830 cm^{-1} est celui des OH secondaires dans la conformation équatoriale, comme dans le cas du glucose 4-Sulfate. Enfin le dernier pic signalé, est pour le groupe ester sulfate secondaire en position axiale qui se trouve à 850-860 cm^{-1}, tel est le cas du galactose 6-Sulfate.

3° Dégradation enzymatique.

Certaines enzymes comme la chondroitinase ABC ou AC sont employées pour distinguer les sulfates esters isomères entre eux, la chromatographie des produits digérés permet ensuite de localiser les sites des divers groupes O-Sulfates. Les chondro 4 et 6 sulfatases sont aussi utilisées, les résultats n'entont pas été exploités, faute de matériels. Les sulfates organiques libérés confirment en outre la présence de tels ou tels esters étudiés.

Distinction des esters sulfates et sulfonates.

Selon certains auteurs, les lipides soufrés des végétaux supérieurs sont composés de sulfoquinovosyl diglycérides en majorité et d'alcools gras sulfatés, en plus faible quantité, et ce dans la plupart

des cas. BENSON (59-60) en 1959 a introduit cette nouvelle classe de sulfonolipides. Les plus connus d'entre eux de nos jours, sont les 6-déoxy galactosyl sulfonates diglycérides. Ces substances par opposition aux sulfatides classiques ne donnent pas par hydrolyse ménagée des sulfates, et leur présence n'a pas été signalée chez les animaux. Les sulfonolipides sont très polaires et s'ionisent facilement en milieu aqueux, leur extraction en est donc rendue très difficile, d'autant plus qu'ils sont fortement retenus dans les résidus. Ils ne peuvent être libérés que par destruction partielle de ces résidus Chez les algues brunes, nous avons trouvé à côté des sulfonolipides et dans les mêmes molécules, d'autres constituants soufrés qui libèrent facilement des sulfates par hydrolyse douce. Cette présence simultanée des sulfates et sulfonates dans une même molécule lipidique montre leur nature complexe . En outre dans le cas des glycosyls sulfates diglycérides les esters sulfates et sulfonates peuvent se trouver soit sur un seul sucre, soit sur des sucres différents constituant la molécule lipidique. L'hydrolyse par étapes de ces lipides complexes en présence du méthanol chlorhydrique 2N à 60°C pendant 15-20 heures, libère dans le premier temps les sulfates esters lipidiques. Repris par le méthanol/chloroforme 1/1 et passés sur colonne de DOWEX 50 forme H^+, les lipides désulfatés élués de la colonne sont ensuite remis en solution alcoolique dans du méthanol (RP), et soumis de nouveau à l'hydrolyse en présence de ClH 2N + 1,5 volume d'eau pendant 30 heures à 100°C. Ils donnent encore un deuxième contingent de sulfates, environ 6-8 % supplémentaires .Ces derniers ne sont libérés que par hydrolyse forte et prolongée.

En fiole de Schöniger et en présence de NO_3H/HCL/NaCl en excès, l'ensemble des sulfates et sulfonates esters est directement minéralisé et la teneur en sulfates libérés est plus élevée que celle trouvée précédemment mais dans l'ensemble elle correspond à la teneur totale après deux hydrolyses successives. Ceci corrobore la présence simultanée, dans la même molécule de lipides soufrés, d'un ester sulfate et d'un ester sulfonate. Les différentes méthodes de caractérisation des sulfates et des sulfonates que nous employons sont les suivantes :

A. Caractérisation des sulfates.

1) Point de fusion : les sels de potassium cristallisés, souvent amorphes et très hygroscopiques, peuvent être caractérisés par leur point de fusion très net.

2) Séparation par chromatographie sur papier et électrophorèse

Les solvants neutres et acides donnent une migration assez lente. En présence de certains détergents cationiques les mobilités des sulfates sont plus grandes. Dans ce système les polysulfates migrent plus vite que les monosulfates. En électrophorèse le pH du tampon utilisé importe beaucoup. A pH 4-7 la mobilité dépend seulement du nombre de groupes sulfates présents dans la molécule et aussi du volume de celle-ci. Dans un tampon borate alcalin, la mobilité dépend en plus de la nature du complexe formé avec le borate

3) Spectres infra-rouge.

ORR (51), étudiant les spectres IR de polysaccharides sulfatés, note qu'il existe en plus des bandes d'absorption à 1240 cm^{-1} attribuées à la liaison S-O, des bandes à 820 cm^{-1} attribuables aux groupes C-O-S. La position exacte de cette bande dépend de la configuration des groupes sulfates. La position équatoriale donne une bande à 820 cm^{-1} et la position axiale 855 cm^{-1}. LLOYD et DOGSON (62-63) signalent en outre que les hexoses 6-sulfates donnent des bandes à 820 et 832 cm^{-1} si le groupe sulfate est porté par l'hydroxyle secondaire par exemple dans le cas du D Glucose 3-sulfate. De même un certain nombre d'alkylsulfates ont été étudiés : les pics à 1030 et 1050 cm^{-1} et à 770 et 870 cm^{-1} ont été attribués aux liaisons C-O, S-O et C-O-S respectivement. Par ailleurs les pics à 8oo cm^{-1} dépendent de la position primaire et secondaire dans une chaîne ouverte, ou de la position secondaire dans un système cyclique.

Il en résulte que l'apparition du pic à 850 cm^{-1} dans un spectre caractérise la présence d'un sulfate ester en position secondaire axiale tel est le cas du Sulfate en C4 du galactose en conformation C1. Les pics 800 cm^{-1} et 860 cm^{-1} sont caractéristiques des C4 sulfates et celui à 8I5 est dû au C6 sulfate isomère du premier. Il est ainsi évident que sucres et polysaccharides sulfatés ont tous une bande à 1250 cm^{-1} et une autre dans la région comprise entre 8I5 et 860 cm^{-1}. Pour les hexoses les pics à 8I0-820 cm^{-1} sont caractéristiques du 6-sulfates dans la conformation C1 (D). Le pic à 830 cm^{-1} peut être attribué aux groupes sulfates en position équatoriale secondaire et les pics à 850-860 cm^{-1} aux groupes axiaux secondaires.

Cette méthode physique est classique mais l'interprétation des spectres n'est pas toujours facile. Il faut surtout se garder de conclusions hâtives, d'autres techniques doivent être employées parallèlement afin d'avoir une certitude suffisante quant à l'interpréta-

tion des résultats.

4) Oxydation périodique .

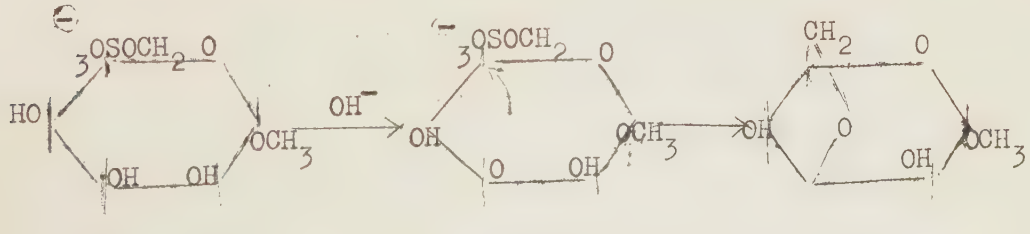
L'utilisation de la méthode d'oxydation périodique préconisée par T. DILLONET et J.Mc KENNA (64-65) et V.C BARRY,J.E Mc CORMICK (66), permet d'étudier les groupes esters sulfates des diverses molécules. Cette méthode valable pour les glycosides sulfatés en particulier, est employée surtout, pour déterminer les structures des glucides. L'oxydation périodique du glucose sulfaté est plus ou moins vive et le nombre de molécules de périodates consommées donne une idée sur les groupements sulfates, leur position, et leurs liaisons avec le glucide. Si les liaisons sulfates sont stables, l'oxydation périodique ne peut les atteindre même à pH 8,2.Une solution 7,5 Moles ne peut libérer aucun ion sulfate et ce, même après 9 jours d'oxydation continue à température ambiante. Enfin les esters sulfates peuvent être détectés dans les produits oxylés par électrophorèse sur papier.

5)Hydrolyse acide.

Les sulfates comme leurs esters peuvent être hydrolysés en milieu acide ou basique. L'hydrolyse acide des liaisons sulfates esters se fait avec rétention de la configuration du carbone porteur du groupe hémiester sulfate dans le cas du D glucose 3-sulfate et du galactose 4-sulfate par exemple. La vitesse d'hydrolyse, en présence de HCl 2N, dépend aussi du type des liaisons esters et de leur position sur la molécule.

6)Hydrolyse alcaline.

Utilisée au cours de ses travaux par E.G.V PERCIVAL (67-68), elle donne des renseignements intéressants. L'hydrolyse en milieu basique du sucre sulfaté est très longue. Le galactose 6-Sulfate peut rester stable dans NaOH 2N pendant plusieurs heures à 100°C. Par contre en présence de base diluée , les sucres sulfatés libèrent facilement leur groupe sulfate à 100°C. La libération des groupes sulfates des glucides, dans lesquels les Cl sont protégés de la dégradation alcaline par méthylation par exemple, ne résulte pas du fait de l'hydrolyse, mais de l'élimination catalytique du sulfate par une base, avec formation cyclique d'éther anhydre interne (69) selon le schéma connu suivant :



L'élimination est accompagnée d'inversion du carbone porteur du groupe ester sulfate comme cela fut observé pour les esters sulfonates des glucides (70-7I). Il est à noter que le groupe OH libre en C2 est nécessaire pour l'élimination des sulfates bien que le produit final ne soit pas le composé 2,3 anhydre. Cette permutation est valable pour les esters sulfates et aussi pour les esters sulfonates correspondants.

7) Acétonolyse et méthanolyse.

La désulfatation peut aussi se faire par acétonolyse ou par méthanolyse indifféremment. Comme pour l'hydrolyse acide, la réaction est produite par attaque nucléophile des ions $CH_3C=O$, conduisant à la scission de la liaison S-O donnant une rétention de la configuration. KANTOR et SCHUBERT M.(72-73) ont signalé que ClH 0,06N dans le méthanol anhydre désulfate la chondroïtine sulfate à température ambiante. Toutefois si les liaisons glycosidiques ne sont pas rompues, les dépolymérisations des polysaccharides par exemple sont très fréquentes.

8) Désulfatation réductive.

Les sulfates esters sont résistants aux hydrolyses catalytiques. En présence d'hydrures d'aluminium et de lithium, l'hydrogénation peut avoir lieu, mais l'usage des hydrures d'aluminium et de lithium ne peut se faire qu'en milieu solvant inerte tels que : éther, dioxane. Ces derniers ne dissolvent pas les substances hydrosolubles, or les produits de désulfatations sont tous des alcools. Les sulfonates, au contraire, donnent dans les mêmes conditions le 6-désoxyhexoside. Il semble très significatif que les oligosaccharides sulfates, sous forme hémiester, soient résistants à l'égard des hydrures d'aluminium et lithium et qu'ils soient réduits quand les diester sont formés.

En plus de ces différents méthodes de caractérisation des sulfates esters, nous disposons encore de techniques analytiques très efficaces pour le dosage des sulfates libérés. Citons entre autres, les méthodes à la benzidine, au chloranilate de baryum .....

Nous avons aussi à notre disposition des méthodes gravimétriques, titrimétriques, turbidimétriques, colorimétriques photométriques : à flamme, etc...Toutes, sont efficaces, sensibles et ne dépendant que de l'équipement du laboratoire d'accueil. Nous avons utilisé pour notre travail des méthodes chimiques, simples, efficaces, en particulier les méthodes colorimétriques et titrimétriques. Certaines mé-

thodes physiques comme les spectrométries IR , de masse, ont été utilisées aussi et les résultats concordaient tant pour la caractérisation que pour le dosage des sulfates de nos lipides.

B. Caractérisation des sulfonates esters.

La chimie des sulfonates a connu depuis une trentaine d'années un essor considérable, en raison de l'importance de ces esters employés dans divers domaines chimiques et notamment en chimiothérapie. L'étude des esters sulfoniques a été rendue facile par les développements considérables des méthodes physicochimiques d'isolement, et leurs études structurales. Les méthodes chromatographiques sur colonnes et sur couches minces, sont les moyens de séparation les plus courants. La chromatographie en phase gazeuse reste une technique analytique efficace surtout pour les esters sulfonates des glucides. La spectrophotométrie IR combinée à la RMN donnent des renseignements très précieux au cours de l'analyse de ces composés.

1) Spectrophotométrie IR.

Les premières études des spectres IR sur les sulfonates esters des glucides ont été faites par R.S TIPSON (74), sur les 1,2,3, 4 tétra O-p-toylsulfonylérythritols et les 1,O-p-tolylsulfonylglycérols. Cet auteur a montré que la bande d'absorption entre 1600-1 1800 cm^{-1} est due aux vibrations du noyau aromatique et du C-H para-substitué du noyau phényl respectivement. Le groupe p-tolylsulfonyloxy donne aussi une bande entre 1360-1180 cm^{-1} due aux vibrations symétriques du groupe SO_2.

ONODERA et coll (75-76) ont montré que la bande 800-900cm^{-1} est caractéristique de la différence entre la position axiale et équatoriale du groupe sulfonyloxy. En position axiale ce groupe donne une bande très forte à 890 cm^{-1} et en position équatoriale entre 840-850 cm^{-1}, dans la conformation C1 (D). Ces bandes sont caractéristiques des vibrations des liaisons C-O-S.

2) Désulfonylation du groupe sulfonyl.

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour libérer les groupes sulfonyls des molécules. Elles sont plus ou moins efficaces, dépendant de plusieurs facteurs. Les méthodes réductives en milieu alcalin pour régénérer les hydroxyls, ainsi que l'emploi des déplacements par des nucléophiles sont les méthodes les plus utilisées. SCHMID et KARRER (77-78) ont montré que le traitement des 1,2,3,4 diisoprppylidène 6-O-p-tolylsulfonyl-D-Gal, par les hydrures de lithium et d'aluminium dans l'éther/benzène bouillant 2/1(v/v), produit une désulfonation et donne le 1,2,3,4 di-O-isopropylidène-D-Fucose à 55%. Cette méthode de réduction trouve son application dans de nombreux domaines.

3) Actions de quelques réactifs alcalins.

La transformation des esters sulfoniques en sucres anhydres a été profondément revue et utilisée extensivement depuis. La réaction des dérivés du 2-O-Sulfonyl des sucres libres par le méthoxyde de sodium, entraine la formation initiale du sucre 1-2 anhydre, suivie de la production du méthylglycoside du C2 épimérique des sucres, dans lequel l'hydroxyle en C2 est devenu trans par rapport au groupe méthoxyl du C1.

L'emploi d'hydroxyde de baryum en solution aqueuse donne aussi les désulfonations du 2-p-O tolylsulfonyl ou le 2-O méthylsulfonyl, dérivés des D-arabinose, D-xylose et L-fucose.

Toutes ces méthodes permettent l'exploration des esters sulfonates de lipides. Notons enfin que l'hydrolyse des sulfonolipides peut aussi se faire en milieu acide. Ainsi les 1-Naphtylsulfonique acides sont clivés en naphtol et sulfates à 10 % environ en 5h à 110°C et en présence d'eau. De même l'acide chlorhydrique 1,5N en milieu aqueux à 100°C pendant 30 à 35 heures peut libérer 4% environ des sulfonates lipidiques.

Méthodes analytiques des sulfonolipides.

Les méthodes analytiques des sulfonolipides sont très variées, leur choix est guidé par la nature des sulfonolipides considérés. La destruction de la structure des sulfonolipides suivie de l'analyse du soufre formé, la déshydratation dans l'anthrone du sucre sulfonaté, la formation des complexes cationiques colorés, suivie d'une étude spectrophotométrique dans un zone de longueur d'onde déterminée...., et enfin les méthodes physiques telles que spectrophotométrie IR, sont, entre autres, des techniques efficaces que nous avons utilisées couramment, pour cette étude. Sur le plan pratique la méthode de destruction oxydative en fiole de Schöniger, suivie de l'analyse spectrophotométrique des produits formés est la seule qui puisse être employée par tous, elle est de plus très efficace. L'emploi de "l'azur A" et du crésyl "fast violet", préconisé par KEAN (79) et Mc CANDLESS (80-81) respectivement, pour caractériser les sulfonolipides sur plaques chromatographiques, sont malheureusement très peu specifiques et les résultats ne sont pas toujours très exploitables. Par contre la méthode préconisée par WEENINK R.O. (82), pour la détection spécifique des acides 6-déoxyhexosesulfoniques par l'anthrone nous a donné de bons résultats. Cette méthode repose sur le fait que les sulfonosucres sont sélectivement absorbés par la lumière à 592 nm, dans le domaine du visible, alors que l'ose correspondant ne donne aucune absorption spectrale dans cette zone. Elle nous a servi aussi à caractériser les lipides de nos algues de façon très satisfaisante

PREMIERE PARTIE.

I. Profil des lipides polaires des trois Fucacées étudiées. p.45

II. Etudes des structures des lipides polaires de Pelvetia canaliculata (L) Decn. et Thur. p.47

III. Applications à la détermination des structures des lipides séparés $X_1 \ldots X_{16}$. p.50

A. Etudes des structures de X_1. Identification du lipide. p.51
B. " X_2 et identification. p.52
C. " X_3 " p.53
D. " X_4 " "
E. " X_5 " p.54
F. " X_6 " p.55
G. " X_7 " p. 57
H. " X_8 " p.59
I. " X_9 " p.60
J. " X_{10} " p.61
K. " X_{11} " p.62
L. " X_{12} " p.63
M. " X_{13} " p.64
N. " X_{14} " p.65
O. " X_{15} " p.67
P. " X_{16} " p.

IV. Conclusions. p.68

V. Etudes comparatives des lipides polaires de Fucus vesiculosus et Fucus serratus par rapport à ceux de Pelvetia canalicualta. p.70

A. Structure, composition et teneur des lipides polaires de Fucus vesiculosus (L). p.70

1) structure et composition.

2) Teneur en lipides polaires des 3 groupes.

B. Structure, composition et teneur des lipides polaires de Fucus serratus (L). p.71

1) Structure et composition.

2) Teneur en différents lipides polaires.

VI. Conclusions. p.73

PREMIERE PARTIE.

I. Profil des lipides des trois Fucacées étudiées.

Les trois algues brunes que nous étudions (83) possèdent entre deux et quatre grammes de lipides totaux pour cent grammes de matières sèches, selon les espèces. Les lipides polaires de ces végétaux marins sont par ailleurs qualitativement et quantitativement très variables. En général, leur teneur varie entre 45-56% des lipides totaux. Ce taux varie suivant l'âge des thalles, leur état physiologique au moment de la récolte (Tableaux IIIa - IIIb-planche 2). Pelvetia canaliculata (L), sont des trois algues, les plus riches en lipides polaires totaux : 50-58% des lipides totaux. Fucus vesiculosus (L) en possèdent 52-54% et Fucus serratus (L) les moins pourvus :50-52%. Ces chiffres englobent les pigments polaires(84-85) qui représentent 22-25% des lipides totaux pour les trois espèces. Les zones végétatives, des thalles fructifiés, sont en général plus riches en lipides polaires que les zones gamétogènes.

Concernant les acides gras constitutifs des lipides polaires, nous avons noté que , ceux de Pelvetia canaliculata (L) sont plus saturés que ceux des deux autres espèces. Chez les trois algues, les acides gras tendent vers une insaturation potentielle très nette surtout lors de la mauvaise saison. Les lipides polaires totaux des trois Fucacées peuvent être groupés en trois classes principales. Dans la première classe nous groupons tous les esters phosphates diglycérides généralement appelés phosphatidyls glycérols. Le deuxième groupe englobe les glycosyldiglycérides. Les sucres constitutifs peuvent être estérifiés par une ou plusieurs molécules d'acides sulfurique ou phosphorique. Le troisième groupe réunit tous les lipides polaires contenant du soufre sous forme d'esters sulfates ou sulfonates.

Les taux en souffre et en phosphore des lipides polaires varient aussi avec les espèces. Pelvetia canaliculata (L) sont en général riches en soufre total et pauvres en phosphore total. Fucus vesiculosus (L) aussi, mais les écarts des teneurs en ces deux éléments sont relativement faibles. Fucus serratus (L) sont riches en phosphore total mais assez pauvres en soufre total. En ce qui concerne les lipides polaires individuels Pelvetia canaliculata en possèdent 15-16 environ. Certains de ces lipides polaires ne sont présents que dans les thalles très jeunes;les thalles fructifiés en sont totale-

TABLEAU IIIa

Composition et teneur des lipides polaires individuels dans les zônes végétatives et gamétogènes des 3 Fucacées.

Espèces	Zônes	Pds PL_T /100g de LP_T	Pds SL_T /100g de LP_T	Pds P /100g dePL_T	Pds S /100g deSL_T	Pds PC /100g de PL_T	Pds PE /100g de PL_T	Pds PS /100g de PL_T	Pds PI /100g de PL_T	Pds MG etDGDG /100g de LP_T	Pds SL_1 /100g SL_T		Pds SL_2 /100g SL_T		Pds SL_3 /100g SL_T	
											Rf	%	Rf	%	Rf	%
Pelvetia canaliculata	Z.♂ Z.v	4-5 19-22	6-9 27-29	1,2-1,3 4-4,2	1,3-1,5 7,2-7,4	10-13 18-22	7-9 10-15	7-8 12-13	1-2 6-10	2,5-3,6 19-22	0,9	5-6 10-12	0,85	11-13 60-65	0,25	4-6 28-35
Fucus vesiculosus	Z.♂ Z.v	3-4,2 24-25	6-9 20-22	1,5-1,6 5,6-6	1,3-1,5 6-6,2	10-12 15-20	8-10 16-20	6-8 14-18	1-3 5-8	2-4 16-18	0,9	4-5 15-16	0,85	7-10 50-51	0,25	4-8 40-42
Fucus serratus	Z.♂ Z.v	4-6 28-32	7-8 15-16	1,5-1,7 6,1-6,4	1,1-1,2 4-4,2	9-10 12-15	9-10 21-23	9-11 10-12	0,5-1 4-6	1-3 22-28	0,9	4-4,5 15-19	0,85	10-12 30-35	0,25	12-14 50-58

Z.♂ = Zône gamétogène
Z.v = " végétative
P = phosphore
S = soufre
PC = phosphatidyl choline
PE = " éthanolamine
PS = " sérine
PI = " inositol

PL_T = phospholipides totaux
SL_T = sulfolipides totaux

LP_T = lipides polaires totaux (avec pigments pol)
MGDG = monogalactosyl diglycérides
DGDG = digalactosyl diglycérides
SL_1 = sulfolipide n°1
SL_2 = sulfolipide n°2
SL_3 = sulfolipide n°3

TABLEAU IIIb

Compositions et teneurs en acides gras des différents lipides polaires individuels.

Acides gras	PA	PC	PE	PS	PI	MGDG	DGDG	SL_T
C16:0	39%	40%	36%	5%	12%	3%	4%	40%
C18:0	2%	6%	5%	2%	traces	1%	3%	1%
C18:1	10%	2%	4%	10%	9%	1%	1%	3%
C18:2	12%	5%	10%	15%	5%	5%	5%	46%
C18:3	35%	41%	40%	58%	72%	80%	75%	7%

PA = acide phosphatidique
PC = phosphatidyl choline
PE = " éthanolamine
PS = " sérine
PI = " inositol
MGDG = Monogalactosyl diglycéride
DGDG = Digalactosyl diglycéride
SL_T = sulfolipides totaux

PLANCHE 2

Chromatographie sur couches minces
des lipides polaires totaux de Pelvetia canaliculata

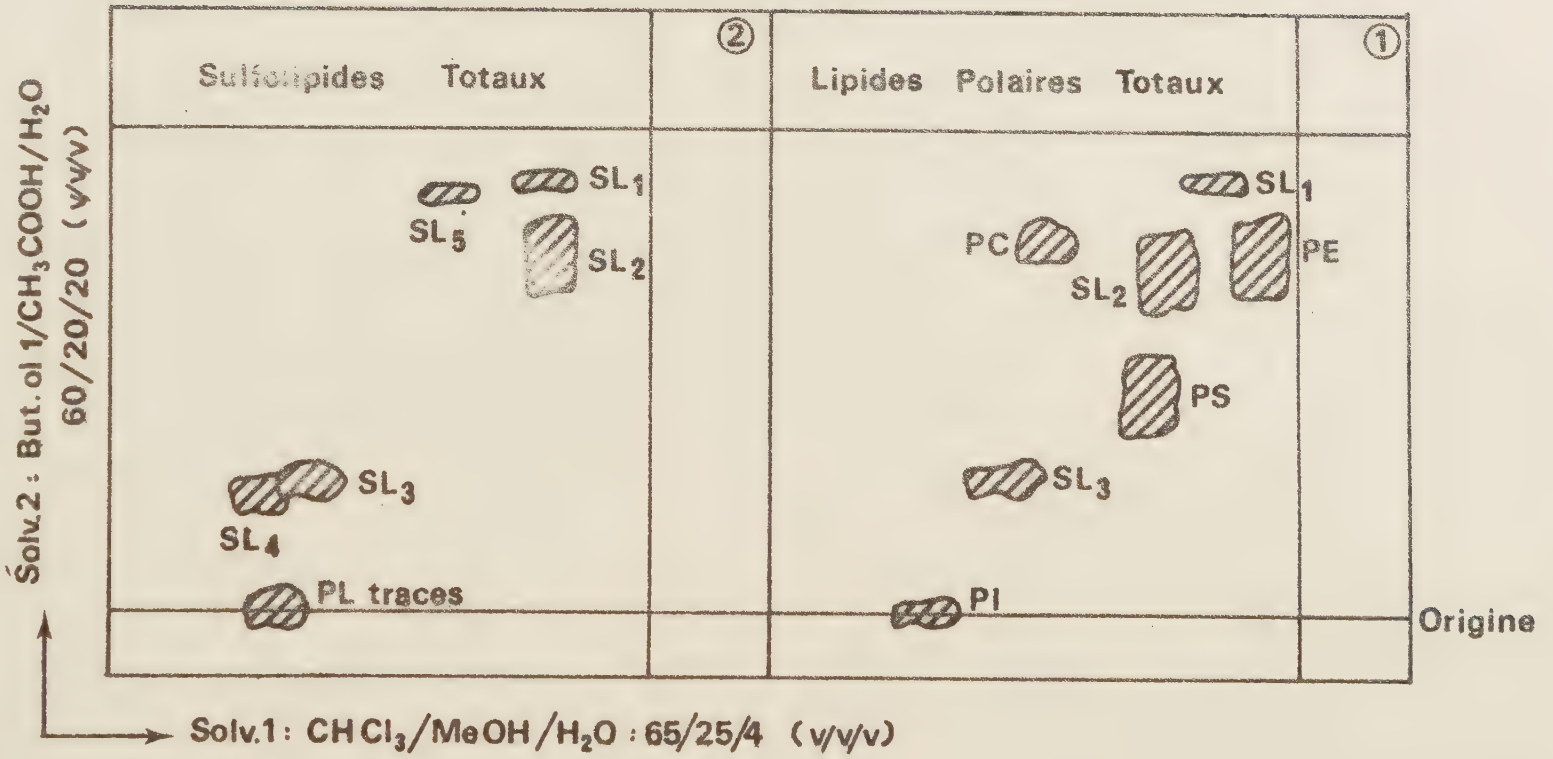
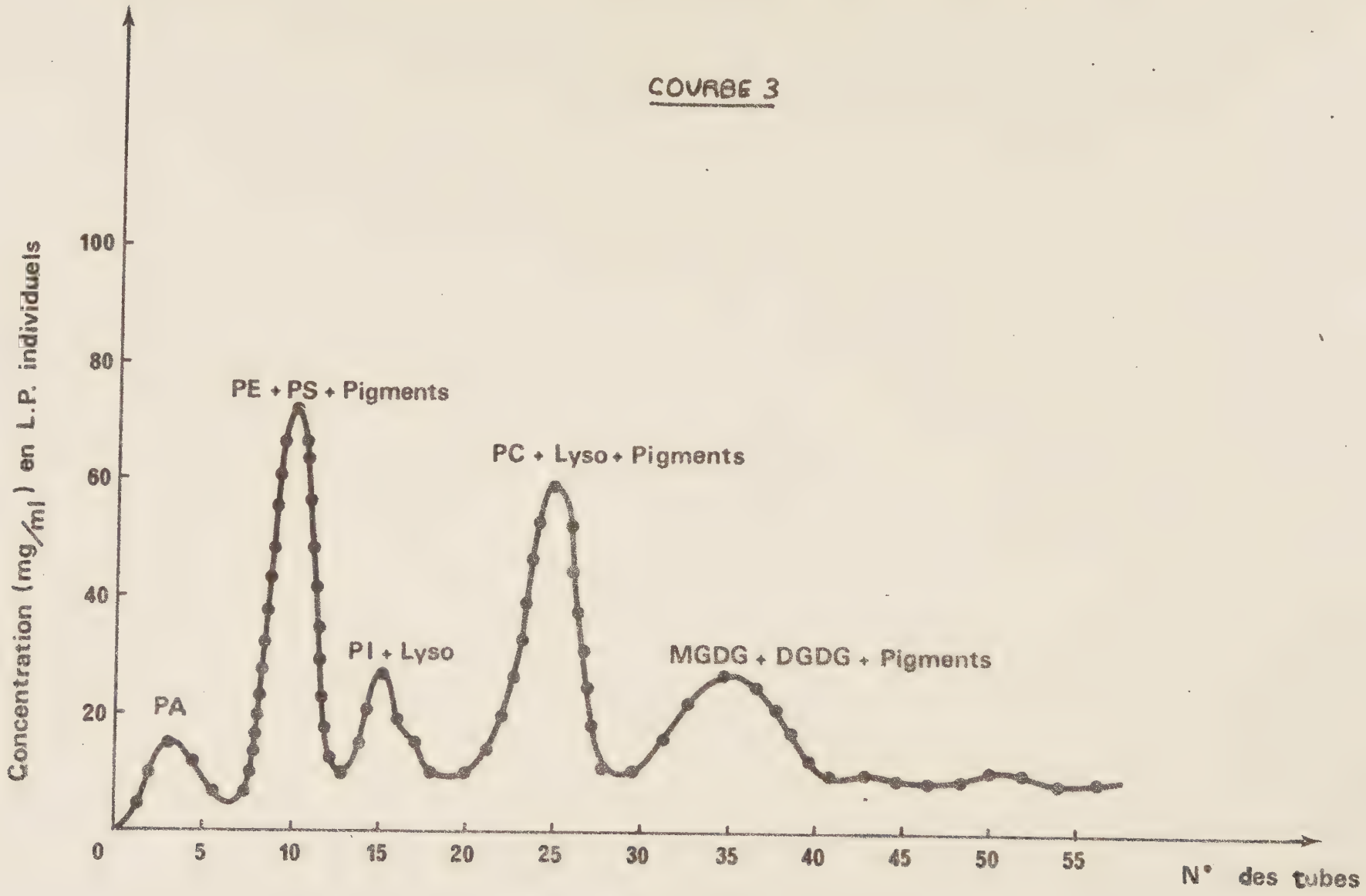


TABLEAU I

Répartition du soufre, du phosphore et de l'azote des fractions obtenues par chromatographie sur colonne de SiO_2 200 Mesh.

N° des tubes	Phosphore mg 10^{-2}	Azote mg 10^{-2}	Soufre mg 10^{-2}
1 - 5	4 - 6	Traces	0
6 - 12	22 - 30	20 - 22	0
13 - 18	8 - 10		0
19 - 25	15 - 18	10 - 13	0
26 - 34	0	Traces	0
35 - 45	0	Traces	0
f_2	Traces	Traces	6 - 6,5

COURBE 3


Concentration (mg/ml) en L.P. individuels
100
80
60
40
20
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
N° des tubes
PA
PE + PS + Pigments
PI + Lyso
PC + Lyso + Pigments
MGDG + DGDG + Pigments

ment dépourvus. Parmi ces 15-16 constituants cinq d'entre eux font partie du premier groupe, cinq à six du deuxième groupe. Le 3ème groupe compte six lipides polaires dont certains sont majoritaires par rapport à tout le reste. Fucus vesiculosus (L) possèdent 14-15 lipides polaires, certains d'entre eux ont des polarités très voisines et ne séparent pas bien, quelque soit la technique de fractionnement utilisée. Cinq des lipides polaires font partie du premier groupe, le deuxième groupe en compte quatre et le troisième cinq à six Fucus serratus (L) comptent 18-22 lipides polaires, le premier groupe en compte cinq, le deuxième groupe, six. Le troisième groupe est de beaucoup, le plus important qualitativement, il contient huit à dix lipides polaires dont plusieurs sont fortement polaires et très ioniques. L'évolution de ces constituants nécessite des systèmes de solvants très polaires contenant une forte teneur en eau ou en acide acétique.

L'étude du profil des lipides polaires des trois Fucacées étudiées conduit aux constations suivantes :

1° Bien que ces trois algues appartiennent, toutes à la même famille des Fucacées (Phéophycées) leur répartition écologique, par rapport au littoral, est différente. Chacune d'elle possède ainsi teneur et composition en lipides polaires caractéristiques de l'espèce.

2° Les acides gras constitutifs de ces lipides polaires sont potentiellement plus ou moins saturés. La quantité de lumière reçue quotidiennement est un facteur déterminant, dont le rôle est prépondérant.

3° Les algues de surface, notamment Pelvetia canaliculata et Fucus vesiculosus sont plus riches en sulfolipides totaux que les algues de plus grande profondeur telles que Fucus serratus (L) par exemple. Ces derniers sont au contraire plus riches en phospholipides totaux et plus pauvres en sulfolipides totaux

4° Concernant les taux de S et P des lipides polaires (sulfo et phospholipides) pour P. canaliculata sont relativement bas comparativement à ceux de Fucus serratus. Ces derniers ont des sulfo et phospholipides à fortes teneurs en soufre et en phosphore Chez Fucus vesiculosus sulfo et phospholipides ont des taux en S et P équivalents à ceux des sulfo et phospholipides de P. canaliculata.

Les teneur et composition des lipides polaires analysés à titre comparatif sur les thalles très jeunes des trois espèces montrent une variation très nette au niveau des espèces. Cette variation apparait aussi au cours d'un cycle annuel, en relation avec les conditions écologiques et météorologiques locales[10], variables avec les saisons.
Par rapport aux végétaux supérieurs, nous avons noté que les algues brunes étudiées sont plus riches en phospholipides totaux, mais plus pauvres en sulfolipides totaux.
Par rapport aux bactéries, les trois algues brunes considérées sont relativement plus pauvres en phospholides totaux. Elles sont par contre mieux pourvues en sulfolipides totaux que les bactéries. Néanmoins certains auteurs (86-88) ont signalé une richesse relative en sulfolipides totaux des bactéries halophiles dont les teneurs en sulfolipides peuvent être supérieures à celles de nos algues brunes.
Toutes ces constations, suggèrent que chez les algues brunes, les lipides polaires ont chacun une ou des fonction (s) déterminée (s) dans la spécificité de la biologie des espèces ; leur participation dans les activités physiologiques des algues paraissent certaines à plusieurs titres.

II. Etude de la structure des lipides polaires de Pelvetia canaliculata.

Pour déterminer ces structures, nous avons choisi Pelvetia canaliculata. Les lipides polaires des deux autres espèces seront caractérisés et identifiés par comparaison avec ceux de Pelvetia canaliculata.
Afin que ces études comparatives soient possibles, que les interprétations des résultats soient valables, nous avons été conduit à travailler sur des thalles très jeunes physiologiquement actifs et ce chez les trois espèces considérées.
Les échantillons récoltés sont rigoureusement triés pour n'en garder que les sujets très jeunes aux stades d'évolution comparables, autant que possible. Les lipides sont extraits suivant la méthode préconisée antérieurement. Les lipides totaux sont fractionnés sur colonnes de silice MALLINCKRODT 100 et 200 Mesh avec gradient linéaire de polarité, et les éluats sont collectés en soixante fractions désignées par T_1-T_{60}. Les analyses[11] du soufre, du phosphore et de l'azote dans ces fractions ont montré que (tableau I courbe 2) :

1° seules les T_{48} à T_{65} provenant de la fraction acétonosoluble contiennent du soufre. Les fractions T_1 à T_{45} en sont

TABLEAU IIa

Composition qualitative des constituants des lipides polaires individuels dans les différentes fractions obtenues par la chromatogrphie sur colonne de SiO_2 200 Mesh.

N° des tubes	Sucres	Acides Gras	Glycérol	Inositol	Choline	Sérine	Ethanola-mine	Phosphore	Azote	Soufre
1-5	0	++	+	0	0	0	0	+	0	0
6-12	0	++	++	0	0	++	++	++	++	0
13-18	0	++	++	++	0	+	0	++	++	0
19-25	0	++	++	0	++	0	+	traces	+	0
26-34	++	++	++	0	0	0	0	0	+	0
35-45	0	++	+++	0	0	0	0	0	0	0
46-60	0	++	+++	0	0	0	0	0	0	0
61-70	0	traces	0	0	0	0	0	0	traces	0
fraction f_2	++	++	++	0	0	0	0	0	+	+++

0 = absence, + [illegible] PL_T

++ = [illegible] % / PL_T

+++ = 15-20 % / PL_T

TABLEAU IIb

Lipides polaires individuels obtenus par chromatographie sur colonne de SiO_2 200 Mesh. Solvants utilisés : $CHCl_3$/MeOH par gradient linéaire de concentration du MeOH par rapport au $CHCl_3$.

fractions	N° des tubes	classes des Lipides Polaires (LP)	Volumes recueillis en ml	Pds de la fraction recueillie en mg	Pds des lipides individuels obtenus en mg	Pureté des fractions séparées	Erreurs admises	Pds des lipides individuels pour 100 de LP Totaux
$f_3 + f_4$	1-5	PA	50	0,016	0,014	94-96%	± 2%	4,2-5,2
	6-12	PE + PS	80	0,073	0,071	95-96%	± 3%	23-24
	13-18	PI + Lyso PS	50	0,025	0,022	90-93%	± 3,5%	7,1-7,6
	19-25	PC + Lyso PE - PS	70	0,064	0,061	95-96%	± 3%	20-21
	26-34	MGDG-DGDG	80	0,029	0,024	97-98%	± 2%	8-9
	35-45	GL + NI	50	0,0145	0,014	90-92%	± 4%	3,9-4,5
f_2	——	SL + 1-5% de LP NI	100-150 ml d'acétone	0,078	0,075	95-98%	± 1%	27-29
				0,2995	0,2852			94-100

PA = acide phosphatidique
PE = phosphatidyl éthanolamine
PS = " sérine
PC = " choline
PI = " inositol
MGDG = monogalactosyl diglycéride
DGDG = digalactosyl diglycéride
PL_T = phospholipides Totaux
LP^T = lipides polaires totaux
SL^T = sulfolipides
GL = glycolipides
NI = non identifiés

dépourvues totalement. Le phosphore et l'azote ne sont pas présents sinon à l'état de trace, ne dépassant dans aucun cas 1 à 1,5% des phosphore et azote totaux.

2° Le phosphore est présent dans toutes les factions comprises entre T_1 et T_{45} en quantités variables. Les T_1 à T_{25} en possèdent de fortes quantités, les T_{26} à T_{50} au contraire n'en contiennent qu'une faible proportion.

3° L'azote est présent aussi dans toutes les fractions des T_1 aux T_{50}, mais la présence de cet élément n'est significative que dans les fractions comprises entre T_6 et T_{12}, puis de T_{19} à T_{25}. Dans les autres fractions la faible quantité d'azote présent provient des pigments qui souillent la plupart des fractions obtenues.

La caractérisation et l'identification subséquentes des divers constituants moléculaires dans les soixante fractions séparées ont montré en outre que : (Tableaux II a,b courbe 3)

1° Les sérine et éthanolamine sont présentes dans les fractions comprises entre les T_6 et T_{12}. Les fractions T_{19} à T_{25} en contiennent aussi mais en quantité plus faible. Les fractions T_{13} et T_{18} contiennent en outre 2-3% de sérine.

2° Les inositolssont présents dansles fractions T_{13} à T_{18} exclusivement. Dans les autres fractions les inositols n'existent qu'à l'état de trace.

3° Les fractions T_{26} à T_{34} d'une part, et les T_{35} à T_{65} d'autre part, contiennent des glucides. Les autres constituants ne sont présents qu'à l'état de trace.

A l'issue de ces analyses sommaires, nous avons regroupé les différentes fractions en 16 séries distinctes, chacune contenant une espèce chimique définie, de nature lipidique. Nous les designons pour simplifier les apellations : X_1 .....X_{16}. Ces seize lipides polaires de Pelvetia canaliculata seront soumis aux analyses qualitatives et quantitatives pour la détermination de leur structure, après les avoir purifiés au préalable, suivant les méthodes décrites antérieurement.

Les premières analyses portent sur la composition élémentaire des molécules considérées qualitativement et quantitativement. Les résultats obtenus permettent d'établir le nombre de moles de chaque élément constituant la molécule du lipide étudié, et la formule brute à partir des résultats obtenus de la façon suivante :

soient C%, H%, O%, N%, P%, S%, les teneurs des différents éléments par 100 grs de lipide, Les Poids moléculaires de ces éléments étant: C=12,H=1,O=16,N=14,P=32,S=35.

Le nombre de Moles de ces différents éléments sera obtenu par les calculs suivants :

Nombre de Moles de Carbone = C% : 12————————n Moles de C
Nombre de Moles d'Hydrogène= H% : 1,001————————m Moles de H
Nombre de Moles d'Oxygène = O% : 16———————— p Moles de O
Nombre de Moles d'Azote = N% : 14———————— q Moles de N
Nombre de Moles de phosphore=P% : 32———————— X Moles de P
Nombre de Moles de Soufre = S% : 35———————— Y Moles de S

L'un de ces éléments faiblement représenté peut être considéré comme élément unitaire, et servant d'élément de base et on pourra déterminer les proportions des autres éléments par rapport à lui. Soit S par exemple cet élément unitaire considéré, on aura :

n Moles de C : Y Moles de S ————————a
m Moles de H : Y Moles de S ———————— b
P Moles de O : Y Moles de S ———————— c
Q Moles de N : " ———————— d
x Moles de P : " ———————— e

a,b,c,d,e étant des nombres entiers ou arrondis à l'unité près, la formule brute de la molécule considérée sera la suivante :

$$C_aH_bO_cN_dP_eS$$

Le poids moléculaire calculé d'après la formule brute obtenue sera:

$$12a + 1b + 16c + 14d + 32e + 35 = PM_1$$

Si S=1 donne un PM_1 moitié moindre que la valeur réelle du PM de la molécule considérée on multiplie tous les chiffres obtenus par deux. On aura alors : $2XPM_1 = PM$. D'ou la formule brute corrigée suivante:

$$C_{2a}\ H_{2b}\ O_{2c}\ N_{2d}\ P_{2e}\ S_2$$

Les analyses élémentaires d'une molécule lipidiques considérée doit être complétée par une deuxième analyse des constituants de ce lipide. Elle permet en même temps de confronter les divers résultats et d'élargir la marge de certitude, L'analyse des constituants se fait de la façon suivante :

Soient des acides gras- les glycérols, les phosphates et la sérine, les quatre constituants de la molécule étudiée. Les teneurs, de ces

différents constituants moléculaires, trouvées étant :

X % d'acides gras-Y% de glycérols-Z% de phosphates-P% de sérine.

Les poids moléculaires de ces constituants étant :

Acide palmitique ——————→ PM = 256

Glycérol ——————→ PM = 92

Phosphate ——————→ PM = 96

Sérine ——————→ PM = 88

Le nombre de Moles de ces quatre constituants calculé d'après leur teneur sera donc :

Moles d'acide palmitiques = X% : 256 ——————→ N Moles d'acide palmitique

Moles de glycérol = Y% : 92 ——————→ M Moles de glycérol

Moles de phosphates = Z% : 96 ——————→ Q Moles de phosphates

Moles de sérine = P% : 88 ——————→ T Moles de sérine

Si le glycérol est le constituant unitaire de la molécule les proportions des autres constituants par rapport à lui sera :

Moles d'Acide palmitique : Moles de glycérol ——————→ A

Moles de phosphates : Moles de glycérol ——————→ B

Moles de sérine : Moles de glycérol ——————→ C

La molécule cinsidérée aura la composition suivante :

1 Molécule de glycérol

A Molécule d'acide palmitique

B Molécule de phosphate

C Molécule de sérine

Le poids moléculaire calculé à partir de la formule semi-développée qui en dérive sera donc :

256 A + 96 B + 88 C + 92 ——————→ PM_2

Par ailleurs la détermination du PM de la molécule étudiée, par la spectrophotométrie de masse peut se faire parallèlement et donne des renseignements complémentaires très précieux. Si PM_3 est le poids moléculaire obtenu par cette méthode, la comparaison des PM_1, PM_2, PM_3 permettra d'établir définitivement la structure de la molécule considérée. A 10 % d'erreur près la concordance des trois chiffres est bonne et les résultats obtenus sont acceptables.

III. Applications à la détermination des structures des lipides X_1-X_{16}-

Les analyses et dosages des éléments qui composent les différents lipides polaires séparés sont consignés dans le tableau IV. L'examen de ce tableau montre que les lipides allant du X_1 au X_{10} contiennent

tous du phosphore en plus des éléments de base carbone, hydrogène et oxygène. Les lipides $X_2 \longrightarrow X_5$ contiennent de plus de l'azote. Tous ces lipides proviennent des fractions f_3+f_4, éluées de la colonne de silice . Les lipides $X_{11} \longrightarrow X_{16}$ provenant de la fraction f_2, acétonosoluble, contiennent tous du soufre. Ni le phosphore ni l'azote ne sont présents dans ces lipides. Les résultats des analyses et dosages des constituants moléculaires consignés dans le tableau V. soulignent que les $T_1 \longrightarrow T_5$ contiennent du glycérol, du phosphate et des acides gras. Les T_2, T_3, T_4 contiennent en plus : de l'éthanolamine, de la sérine et de l'inositol respectivement. Le T_5 renferme une base aminée connue : la choline. Les lipides $T_6 \longrightarrow T_{10}$, contiennent du glycérol des acides gras, des phosphates et des glucides. Les séries $T_{11} \longrightarrow T_{16}$ possèdent aussi des glucides, du glycérol, des acides gras comme les séries $T_6 \longrightarrow T_{10}$. La seule différence entre ces deux séries est la présence de sulfates esters de glucides ou d'alcools sulfatés aliphatiques dans la deuxième tandis que les premières séries ne contiennent pas de sulfates. Les teneurs en éléments et en constituants des molécules de lipides polaires de Pelvetia canaliculata permettent donc: d'établir leurs formules brute et développée, de connaître leur structure. L'application des calculs ci-dessus nous conduit à l'identification des différentslipides polaires des trois algues.

A. Etudes des structures de X_1-Identification du lipide.

Les teneurs en différents éléments de ce lipide sont les suivantes (tableau IV)

C= 65% H = 9,45% O = 19,15% N = 0,008% P = 1,55% S= 0

P étant considéré comme élément unitaire, l'application des calculs ci-dessus indiqués conduit au rapport de proportion suivant :

C/P = 38 S/P = 0 N/P = 0 O/P = 8 H/P = 63

Ces valeurs permettent d'établir la formule brute de X_1 comme suit :

$$C_{38} H_{66} O_8 P$$

Le poids moléculaire calculé à partir de cette formule brute sera :

$$PM_1 = 682$$

D'après les résultats d'analyse et de dosage des constituants du tableau V, nous déduisons les proportions respectives des constituants moléculaires par rapport au glycérol, pris comme

TABLEAU IV

Teneur en Soufre, Phosphore, Azote, Carbone, Hydrogène et Oxygène, dand les différents lipides polaires des trois Fucacées étudiées.

Eléments / Lipides	Poids par 100 grammes de lipides des						
	S	P	N	C	H	O	ERREURS
X_I	0,00-0,008	4,5-4,6	0,00-0,01	64-65	9,10-9,4	19-19,20	± 1
X_2	0,02-0,03	4,10-4,2	1,8-1,96	60-62	10,2-11,2	17,4-17,5	± 1
X_3	0,00-0,02	4,2-4,25	1,9-2,00	64-65	10-11,2	17,0-18,2	± 1
X_4	0,03-0,032	3,2-3,9	0,018-0,02	61-62	8,5-9,6	23,6-24,5	± 2
X_5	0,02-0,024	4,1-4,2	1,8-1,90	66-67	10,5-10,6	16,3-16,5	± 1
X_6	0,00-0,003	0,01-0,03	0,08-0,10	77-78	9-9,25	20,2-20,8	± 1
X_7	0,005-0,01	0,0-0,01	0,05-0,08	64-64	9,1-9,21	24,5-25,2	± 1
X_8	0,004-0,009	3,1-3,41	0,01-0,03	54-56	8,1-8,16	29-29,28	± 1
X_9	0,009-0,010	7,3-7,32	0,02-0,022	42-43	6,7-6,92	39,3-39,4	± 1
X_{10}	0,001-0,009	7,6-8,30	0,20-0,214	41-42	7,1-7,20	37,1-40,2	± 2
X_{11}	4,32-4,364	0,01-0,02	0,01-0,012	63-64	9-9,257	23,5-24,4	± 1
$X_{11'}$	4,08-4,122	0,00-0,04	0,00-0,009	64-65	8,7-9,40	22-23,86	± 1
X_{12}	7,70-8,250	0,00-0,09	0,00-0,005	50-52	8,2-8,35	23-23,54	± 1
X_{13}	12-12,527	0,00-0,01	0,00-0,008	44-45	7,5-7,86	23-24,25	± 1
X_{14}	10-11,250	0,00-0,00	0,03-0,036	58-59	10-10,34	21,5-22,5	± 1
X_{15}	10,1?-10,32	0,00-0,01	0,12-0,184	50-52	8,2-12,8	18,5-19,3	± 2
Comparaisons des résultats obtenus par différentes méthodes de dosages effectuées sur les X_9 et les X_{12}							
Dosages effectués par le service de microanalyse de THIAIS.							
X_9	0,01-0,012	7,9-8,20	0,32-0,33	40-42	6,7-6,9	39,3-39,4	± 2
X_{12}	7,08-7,157	traces	0,15-0,28	50-52	8-8,25	23-24,2	± 2
Dosages selon la méthode volumétrique effectués par nous-mêmes.							
X_9	0,02-0,022	7,8-7,92	0,02-0,022	-	—	—	± 1
X_{12}	8,20-8,45	0,01-0,05	0,005-0,01	-	—	—	± 1
Dosages selon la méthode spectrophotomètrique par nous mêmes.							
X_9	0,009-0,01	7,3-7,32	0,01-0,012	-	—	—	± 1
X_{12}	7,7-8,250	0,00-0,090	0,00-0,00	-	—	—	± 1

TABLEAU V

Composition et teneur des différents constituants des seize lipides polaires trouvés chez les trois Fucacées étudiées.

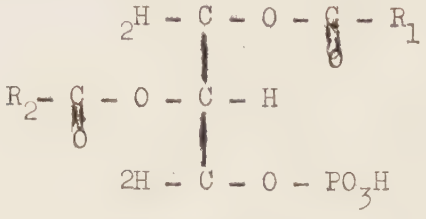
Constituants		Poids par 100 grammes de lipides de :							
Lipides	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$	Glycérol	Sucres	Phosp	Sulfates
X_1	32-33	0,0-0,0	2-4,80	2,2-2,4	30-31	11,5-11,8	0-0,1	14-15	0-0,008
X_2	32-34	0	1-1,52	3-3,10	32-35	11-12	0	12-13	0
X_3	3,5-4	0	5-5,82	10,5-11	33-34	11-13	0	12-12,5	0
X_4	26-27	0	0-0,12	0,2-0,3	28-30	6-7	29(In)	6-8	0
X_5	28-30	0	0,2-0,4	0,3-0,4	29-31	8-9	0-0,05	9-9,6	0,04
X_6	3-3,5	0,02	0-0,25	4-5	45-50	9-11	20-22	7-8,9	0,008
X_7	3-4,2	0	0-0,01	5-6	42-45	9-10	28-32	6-8	0
X_8	20-25	0	0-0,22	0,1-0,2	25-26	9-9,5	30-35	9-9,5	0
X_9	10-15	0	0-0,08	0,2-0,3	17-18	5-6,2	40-42	20-21,5	0
X_{10}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X_{11}	23-24	0	0,0-0,06	23-25	1-4	8-10	20-21	0-0,02	9-10,5
$X_{11'}$	24-25	0	0-0,045	22-24	3-4	9-11	20-22	0-0,15	10-11,2
X_{12}	26-28	0	0,02-0,1	22-23	2-3	9-10,3	20-21	0	9-11,45
X_{13}	20-21	0,008	0,01-0,1	20-22	2-4	8-9,5	28-29	0	22-23
X_{14}	0	0	0	0	0	0	0	0	++
X_{15}	0	0	0	0	0	0	0	0	++
	Proportions des différents constituants par rapport au Glycérol pris comme unité.								
X_1	1,21	0,00	0,01	0,01	1,212	1	0	1,28	0
X_2	1,10	0	0,006	0,02	1,13	1	0	1,1	0
X_3	0,01	0	0,035	0,78	1,30	1	0	1,08	0
X_4	1,10	0	0,002	0,00	1,18	1	0	0,85	0
X_5	1,12	0	0,00	0,008	1,10	1	0	0,68	0
X_6	0,097	0	0,007	0,17	1,30	1	1,09	0,64	0
X_7	0,098	0	0,00	0,19	1,25	1	1,68	0,82	0
X_8	1,10	0	0,002	0,01	1,09	1	1,80	0,92	0
X_9	0,70	0	0,00	0,001	0,91	1	3,95	3,68	0
X_{11}	1,12	0	0,00	1,125	0,02	1	1,09	0,002	0,89
$X_{11'}$	1,13	0	0,00	1,120	0,025	1	1,10	0,005	0,899
X_{12}	1,15	0	0,005	1,109	0,019	1	1,10	0,0099	0,901
X_{13}	0,95	0	0,002	1,10	0,012	1	1,20	0,002	1,820

Nota: In = Inositol.

unité, ce sont les suivantes :

Acide palmitique/Glycérol = 1,210
Acide linolénique/Glycérol= 1,212
Glucose/Glycérol = 0
Phosphates/Glycérol = 1,28

d'où la formule semi-développée déduite pour X_1 :



(R_1 = Reste d'acide palmitique, R_2 = Reste d'acide linolénique.)
Le poids moléculaire calculé à partir de cette formule semi-développée est $\underline{PM_2 = 706}$.
La formule proposée montre que X_1 a une constitution moléculaire très proche sinon comparable à celle de l'acide phosphatidique. Le poids moléculaire théorique de cette substance avec les acides palmitique et linolénique comme constituants moléculaires est évalué à $\underline{669\ (PM_3)}$.
Comparant PM_1, PM_2 et PM_3, les écarts des valeurs existant entre ces trois chiffres sont inférieurs à la valeur de l'écart type. A $\pm$ 10 % ces différents PM se correspondent. Nous avons par ailleurs fait évaluer ce PM par la spectrophotométrie de masse de l'Ecole Polytechnique. La valeur du PM obtenue par cette méthode de détermination est $\underline{PM_4 = 685}$, donc du même ordre de grandeur.

B. Structure de X_2 et identification.

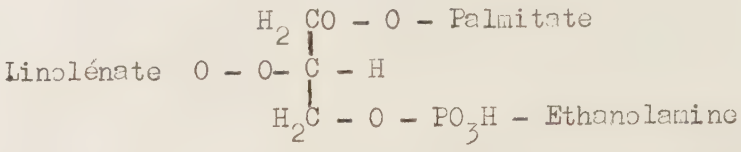
Pour X_2 les teneurs suivantes ont été obtenues : (Tableau IV)
C = 60,65% H = 10,25% O = 17,45% N= 1,96 P = 4,16%
S = 0%
Les rapports moléculaires des différents éléments par rapport au phosphore pris comme élément unité permet d'établir la formule brute suivante pour X_2 :

$$C_{38}H_{76}O_8\ P\ N$$

Le PM calculé à partir de cette formule est $\underline{PM_1 = 706}$
Le glycérol, l'acide palmitique, l'acide linolénique, le phosphate et l'éthanolamine sont les constituants moléculaires de ce lipide. Leur teneur donne les rapports de proportion suivants avec le glycérol pris comme unité : (Tableau V)

Acide palmitique/Glycérol = 1,10
Acide linolenique/Glycérol= 1,13
Phosphates/Glycérol = 1,1
Ethanolamine/Glycérol = 1,20

Ces rapports conduisent à la formule semi-développée suivante :



Le poids moléculaire calculé, à partir de cette formule semi-développée est $\underline{PM_2 = 750}$. Le lipide connu ayant une composition proche de celle de X_2 est la phosphatidyléthanolamine dont le poids moléculaire théoque $\underline{PM_t = 713}$. Le lipide X_2 est un homologue des phosphatidyléthanolamines aux restes acyls près.

C. Structure et identification de X_3.

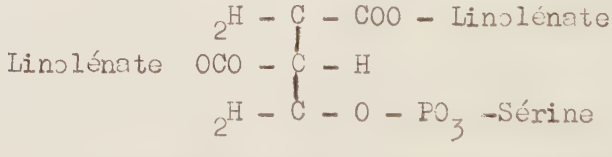
Les teneurs en différents éléments de ce lipide sont : (tableau IV)

C = 64,20% H = 10,50% O = 17% N = 1,96% P = 4,20% S = 0,06%

P étant considéré comme élément unitaire les rapports de proportions conduisent à la formule brute suivante ci-dessous : (tableau V)

$$C_{42}H_{73}O_9P\ N$$

Le poids moléculaire relatif à cette formule brute est $\underline{P_1 = 767}$. Les acides linoléiques et linoléniques, le glycérol, le phosphate et la sérine sont présents dans la molécule de ce lipide X_3. Aux restes acyls près il s'agit bien d'un homologue des phosphatidylsérines connus. La formule semi-développée de X_3 est la suivante :



Le poids moléculaire calculé d'après cette formule proposée est :

$\underline{PM_2 = 818}$

Le PM théroique des phosphatidylsérines avec les restes acyls $C_{18:2}$ et $C_{18:3}$ est évalué à $\underline{787 = PM_t}$, tandis que le spectre de masse indique un $\underline{PM_3 = 750}$. Les écarts des différentes valeurs sont, ici aussi, inférieurs à l'écart type.

D. Structure et identification de X_4.

Les X_4 sont des substances quaternaires, contenant phosphore, carbone, hydrogène et oxygène. Les traces d'azote qu'on y trouve proviennent des pigments qui les contaminent. Leur teneur est en tout

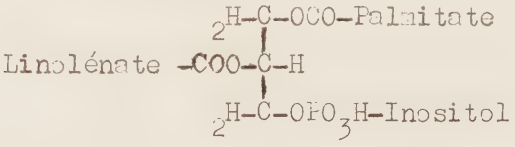
cas trop faible pour être significatif. La formule brute de X_4 sera: tableau IV

$$C_{43}H_{69}O_{11}P$$

Le poids moléculaire déduit de cette formule brute est $PM_1 = 793$
L'analyse des constituants moléculaires révèle la présence, outre le glycérol, de phosphates, d'acides palmitique et linolénique et d'une substance caractérisée par la réaction SCHERER, et qui peut être de l'inositol. Les rapports des proportions des différents constituants trouvés, le glycérol pris comme constituant unitaire, donnent

Acide palmitique/Glycérol = 1,12
Acide linolénique/Glycérol = 1,18
Phosphate/Glycérol = 0,98 (Tableau V)
Inositol/Glycérol = 1,32

Ces valeurs conduisent à la formule semi-développée suivante :



Le poids moléculaire évalué, d'après la formule semi-développée proposée, est $PM_2 = 976$. Le spectre de masse indique $840 = PM_3$, tandis que la valeur théorique des phosphatidylinositols connus est $PM_t = 826$. Les différences entre ces divers PM sont relativement élevées néanmoins les écarts restent toujours inférieurs à l'écart type, par conséquent acceptables. X_4 est vraisemblablement un homologue des phosphatidylinositols connus aux restes acyls près.

E. Structures et identifications des X_5.

Les lipides X_5 sont particulièrement fragiles, thermo et photolabiles. Les manipulations doivent être conduites avec beaucoup de précautions à défaut de quoi les résultats sont difficilement interprétables. X_5 compte cinq éléments dont C,H,O,N,P. Les proportions des éléments par rapport au phosphore pris comme unité, permet de proposer la formule brute suivante, pour X_5 (tableau IV)

$$C_{41}H_{79}O_8\ N\ P$$

Le poids moléculaire calculé est $PM_1 = 744$
L'analyse des constituants de X_5 montre la présence de glycérol, de phosphore, des acides palmitique et linolénique et enfin de la choline, dans les proportions suivantes (par rapport au glycérol) : (Tableau V)

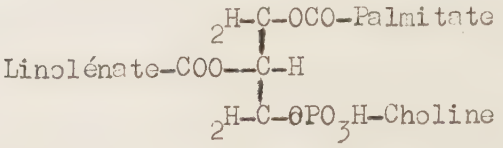
Acide palmitique/Glycérol = 1,018

Acide linolénique/Glycérol= 1,10

Phosphates/Glycérol = 0,98

Choline/Glycérol = 1,15

La formule semi développée de X_5 est donc :



Le PM_2 évalué est de 793. Le PM_t des phosphatidylcholines de sources différentes et de composition moléculaire voisine de celle de X_5, est, selon les auteurs, compris entre 756-775. Les écarts par rapport aux valeurs trouvées sont attribuables aux restes acyls qui ne sont pas toujours les mêmes dans ces molécules. Le spectre de masse indique un PM_3 = 710. Aux erreurs d'analyse près, le X_5 est vraisemblablement une phosphatidylcholine.

F. Structure et identification des X_6.

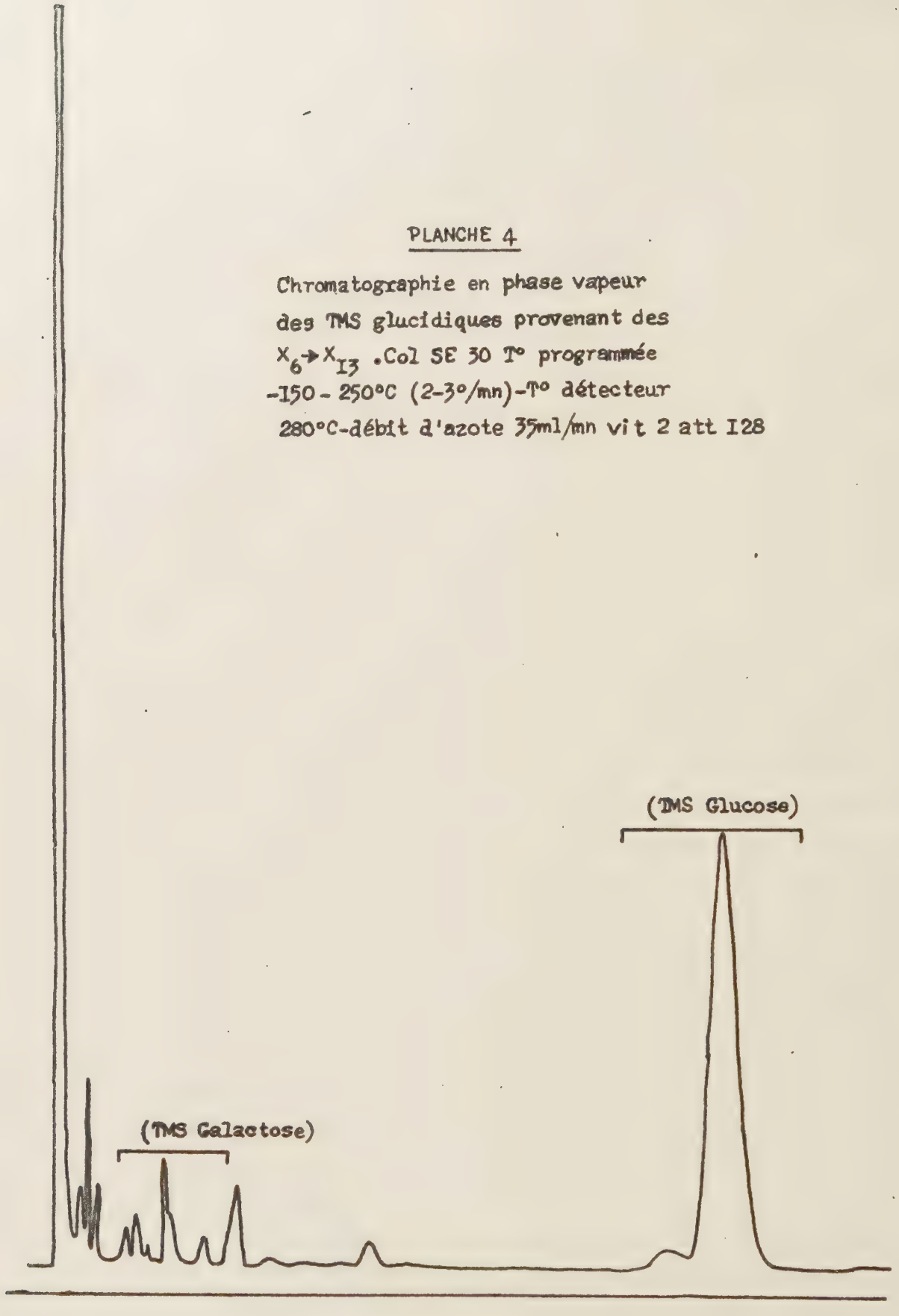
X_6 est en fait l'un des trois lipides élués en une fraction unique de la colonne silice de MALLINCKRODT 200Mesh, (cf partie expérimentale), par le système de solvant à gradient linéaire de polarité. Ces trois lipides (X_6,X_7,X_8), sont de structures différentes, ils ont néanmoins des polarités très proches et leur séparation ne peut se faire avec la colonne de silice. Nous avons alors employé une colonne de DEAE Cellulose (cf partie TE), qui donne de meilleurs résultats. Après leur purification les différents lipides sont soumis aux diverses analyses qualitatives et quantitatives pour la détermination des structures. Les résultats obtenus consignés dans les tableaux IV et V ont conduit aux constatations suivantes :

1° Les X_6 sont des substances ternaires, carbone, hydrogène, oxygène sont les seuls éléments constituants, azote et phoshore n'en font pas partie. Les faibles quantités de ces éléments trouvées dans les différent dosages proviennent de produits de contaminations, à l'état de trace.

2° Les teneurs en C,H,O, sont respectivement 77,82%/9% et 20,51% correspondant à 6,48 Moles de Carbone, 9 Moles d'hydrogène, et 1,28 Moles d'oxygène. Si on considère l'oxygène comme élément unitaire, les calculs des résultats obtenus nous conduiront à la formule brute C_5H_7O et le PM calculé qui en résulte serait = 83. Ce chiffre est inacceptable, car il est trop faible par rapport aux PM_2 et PM_3 obtenus à partir des consti-

PLANCHE 4

Chromatographie en phase vapeur
des TMS glucidiques provenant des
$X_6 \rightarrow X_{I3}$ .Col SE 30 T° programmée
-150 - 250°C (2-3°/mn)-T° détecteur
280°C-débit d'azote 35ml/mn vit 2 att I28



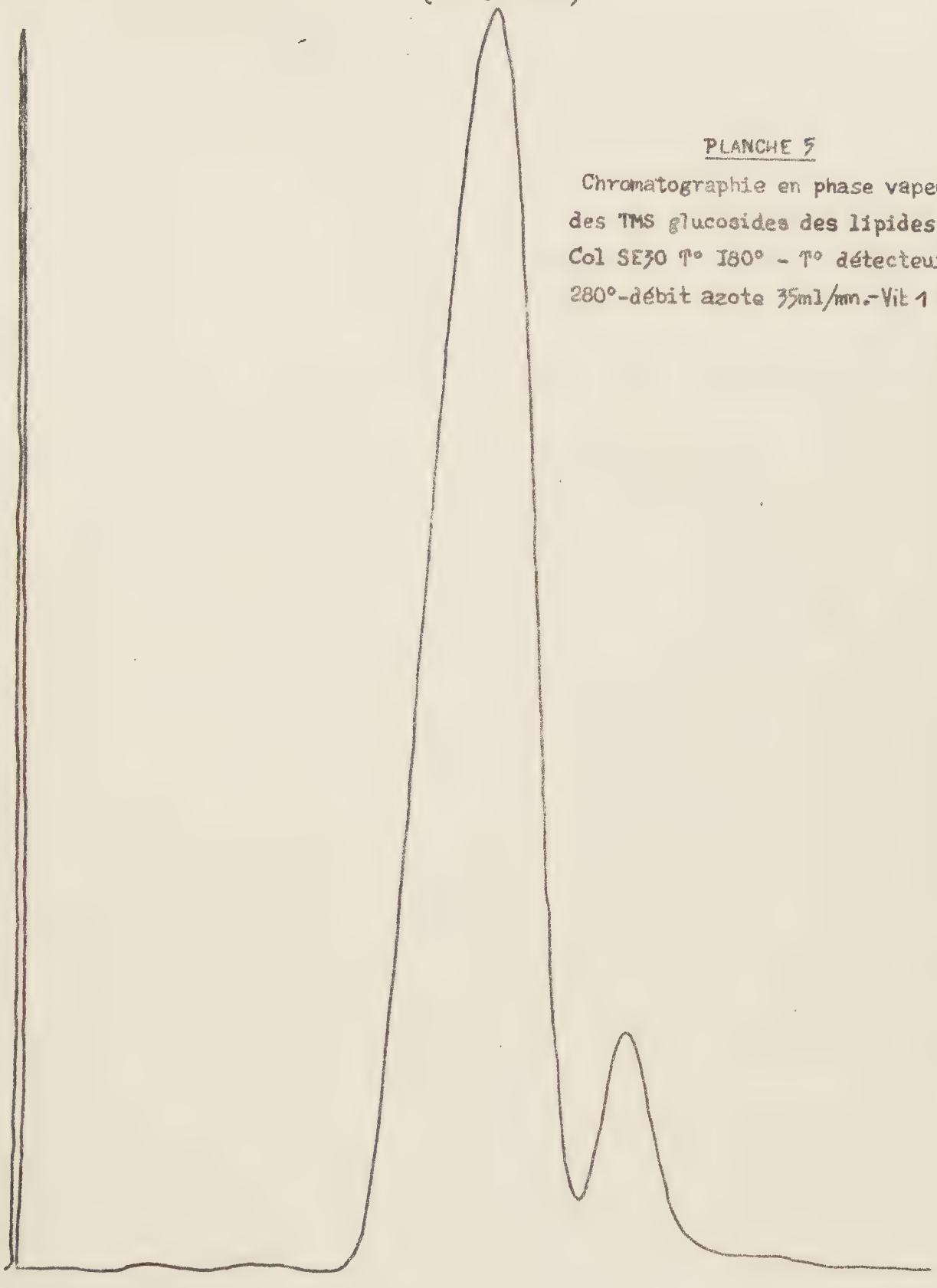


PLANCHE 5

Chromatographie en phase vapeur
des TMS glucosides des lipides X_6
Col SE30 T° 180° - T° détecteur
280°-débit azote 35ml/mn.-Vit 1 att.256

tuants et au spectre de masse. Les différentes valeurs de ces PM sont comprises entre 792 et 819.

L' analyse des constituants a montré en effet que X_6 contient (tableau IV, planches 4.5.) :

3% d'acide palmitique
4,5% d'acide linoléique
50% d'acide linolénique
12% de glycérol
23% de glucose

Les proportions moléculaires par rapport au glycérol pris comunité sont :

Acide palmitique/Glycérol = 0,097
Acide linoléique/Glycérol = 0,17
Acide linolénique/Glycérol= 2,30
Glucose/Glycérol = 1,99

A première vue les acides palmitique et linoléique sont trop faiblement représentés pour être considérés comme constituants moléculaires de X_6 au même titre que l'acide linolénique. Or les acides linoléique et palmitique existent dans les extraits et sont obtenus par saponification des X_6 purifiés. Leur taux est trop élevé relativement pour être des contaminants de X_6, et trop faible pour constituer les deuxièmes restes acyls constitutifs de X_6; ces derniers sont indubitablement des acides linoléniques aussi bien dans la position α que β du glycérol de ce lipide. Il n'est pas impossible toutefois qu'une faible fraction de X_6 soit formée de glucosyl -α palmitate ou linoléate, β linolénate, diglycérides, tandis que la majorité des X_6 sont des α,β dilinolénates diglycérides-glycosides. Cette hypothèse n'est pas à écarter à priori.

3° Le glucide constitutif de X_6 est identifié comme un glucose quelque soit la technique employée. Le composition de X_6 est très proche de celle des monogalactosyldiglycérides connus au constituant glucidique près.

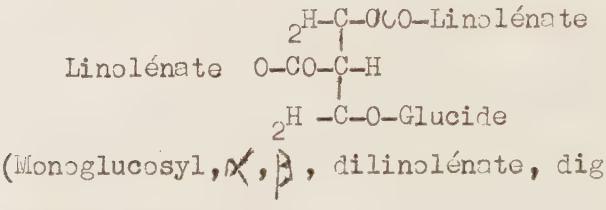
Nous sommes donc amenés aux conclusions suivantes, quant à l'identfication et à la détermination des structures de X_6, à savoir :

1) Compte tenu des valeurs des PM obtenus par calculs, à partir des constituants d'une part, et des spectres de masse d'autre part, la formule brute de X_6 est $C_{49}H_{70}O_{10}$ au lieu de C_5H_7O; considérant O comme élément unitaire ce qui revient à multiplier toutes les indices des carbone, hydrogène et azote de cette dernière formule par 9,59 (792 : 83 = 9,59). La formule brute définitive permet d'obtenir un PM_1 = 818 donc

très comparable aux PM_2 et PM_3 aux erreurs d'expérience près.

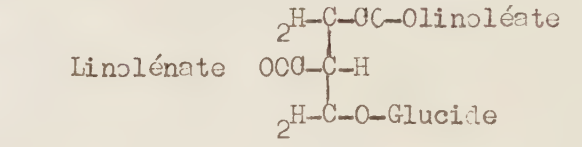
2) les X_6 sont en fait formés de trois lipides possibles de structures identiques. A l'exception de leur compotion en acides gras les autres constituants sont tous les mêmes. Les lipides majoritaires des X_6 peuvent être dénommés des glucosyl-α, β dilinolénate, diglycérides. Les composés minoritaires seraient des glucosyls -α palmitate ou linoléate, β linolénate diglycérides. Les trois formules proposées pour ces trois substances sont alors les suivantes:

1er type moléculaire de X_6



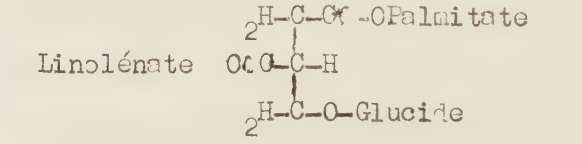
(Monoglucosyl, α, β, dilinolénate, diglycéride)

2èmet type moléculaire de X_6



(2ème type = Monoglucosyl, α linoléate, β linolénate, diglycéride

3ème type moléculaire de X_6



(3ème type = Monoglucosyl, α palmitate, β linolénate, diglycéride

G. Structures et identification de X_7

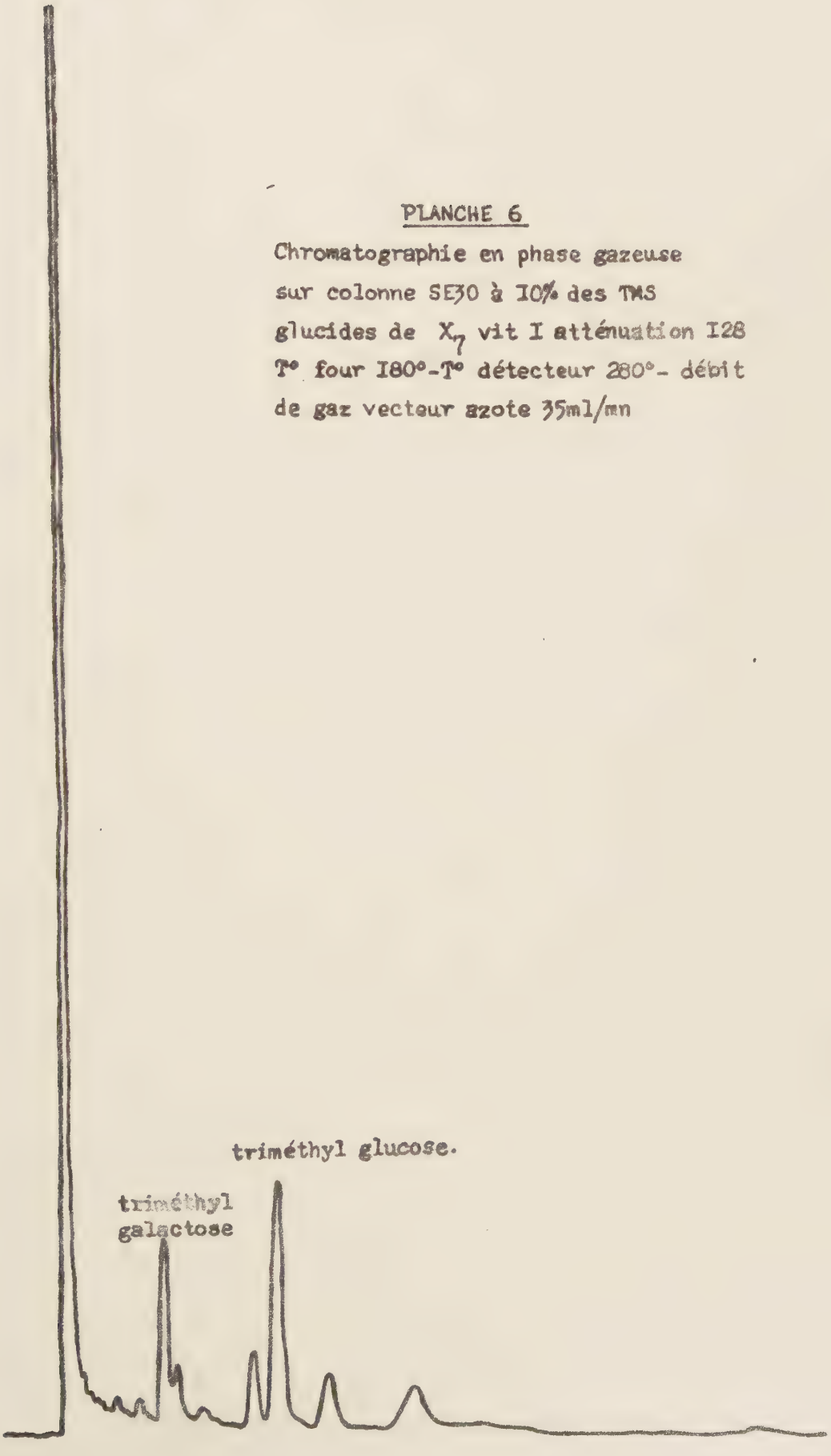
X_7 sont des lipides ternaires comme X_6 migrant ensemble hors de la colonne de silice Mallinckrodt 200 M (cf partie expérimentale) mais sur couches minces ou sur papier, leurs Rf bien que très proches ne se confondent pas. En jouant sur la polarité relative des divers systèmes de solvant, on peut les séparer nettement les uns des autres. Les analyses élémentaires ont montré la présence de carbone (64%), d'hydrogène (9,20%), d'oxygène (25%). L'azote, le phosphore et le soufre ne font pas partie de la molécule X_7. La formule brute qui découle des calculs préconsiés donnent : (Tableau IV)

$$C_{48}H_{96}O_{16} \qquad (PM_1 = 928)$$

L'analyse et le dosage des constituants (tableau V , planche 6) prévè-

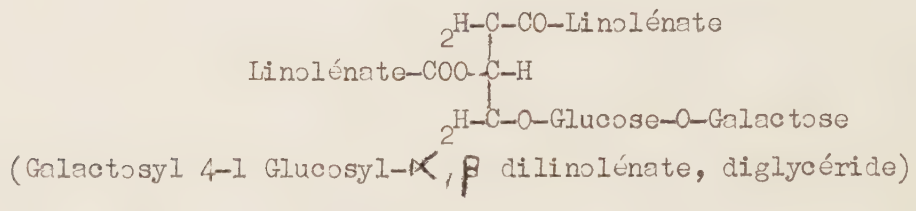
PLANCHE 6

Chromatographie en phase gazeuse
sur colonne SE30 à 10% des TMS
glucides de X_7 vit I atténuation I28
T° four 180°-T° détecteur 280°- débit
de gaz vecteur azote 35ml/mn



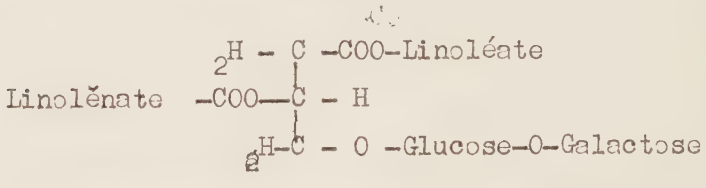
lent la présence d'acides palmitique,linoléique,linolénique, de glycérol et de glucides.Pour les acides gras comme dans le cas de X_6, notons la présence simultanée de $C_{16:0}$,$C_{18:2}$ et $C_{18:3}$,constituants à part entière de X_7.Il n'est pas impossible,ici non plus, que X_7 soient en fait un mélange de trois espèces moléculaires de même structure mais possédant des restes acyls différents. Les constituants majoritaires sont des glycosyl-dilinolénates-diglycérides,tandis que les α palmitates ou linoléates,β linolénates diglycérides ne constituent qu'une faible fraction du mélange.Les sucres identifiés à partir de X_7 sont glucose, galactose en quantités sensiblement équivalentes. Par ailleurs, l'hydrolyse ménagée en milieu acide après méthylation, met en évidence des liaisons C1-C4 entre glucose et galactose. La liaison glucose-glycérol a été démontrée en C4-O-α Enfin les rapports moléculaires des divers constituants moléculaires de X_7 permettent d'écrire les formules semi-développées ci-dessous pour les trois types de molécules de X_7

1er type de molécule de X_7.



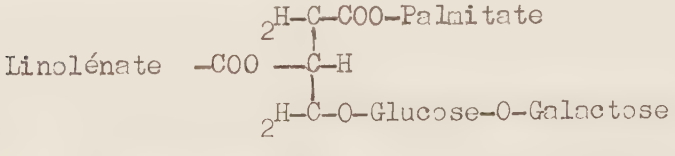
(Galactosyl 4-1 Glucosyl-α,β dilinolénate, diglycéride)

2ème type de molécule de X_7.



(Galactosyl,4-1,Glucosyl-α Linoléate,β Linolénate, diglycéride)

3ème type de molécule de X_7.



(Galactosyl,4-1,Glucosyl-α Palmitate,β Linolénate, diglycéride)

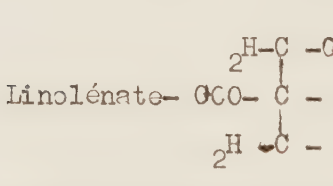
Le poids moléculaire dérivé de ces 3 formules semi-développées est de PM_2 = 928. Les X_7 ont une composition moléculaire comparable à celle des digalactosyldiglycérides connus, mais dans X_7, les glu-

cides sont des glucose et galactose simultanément et non deux galactoses comme dans le cas des DGDG. De plus, les PM des DGDG sont compris entre 920 et 938, selon les auteurs, et les nomenclatures actuelles. On peut considérer les X_7 comme des homologues des Digalactosyl-diglycérides connus, à la composition en acides gras près

H.Structures de X_8 , et identifications.

Les X_8 sont les troisième; lipides formant avec X_6 et X_7 un groupe de substances éluées en une même fraction, hors de la colonne de silice par un système de solvant à gradient linéaire de polarité (cf ci-dessus).Toutefois X_8 se distinguent des X_6 et X_7. En effet dans un solvant basique les X_8 migrent très vite et leur Rf est grand. La séparation des deux autres substances est donc facilitée et la purification ne pose plus de problème particulier. De plus les X_8 sont quaternaires, les analyses et dosages élémentaires ont montré la présence de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et de phosphore. Les teneurs de ces éléments constituants X_8 conduisent à la formule brute $C_{47}H_{85}O_{18}P$, dont le poids moléculaire est PM_1=968 (Tableau IV)

Par analyse et dosage,les acides palmitique et linolénique,le glycérol, le glucose, le galactose et les phosphates ont été identifiés. Glucose et galactose sont liés en C1-C4 et le galactose est en position terminale. Le C6 du glucose est en outre estérifiépar un acide phosphorique. Ces résultats ont permis d'établir la formule semi-développée : (Tableau V)



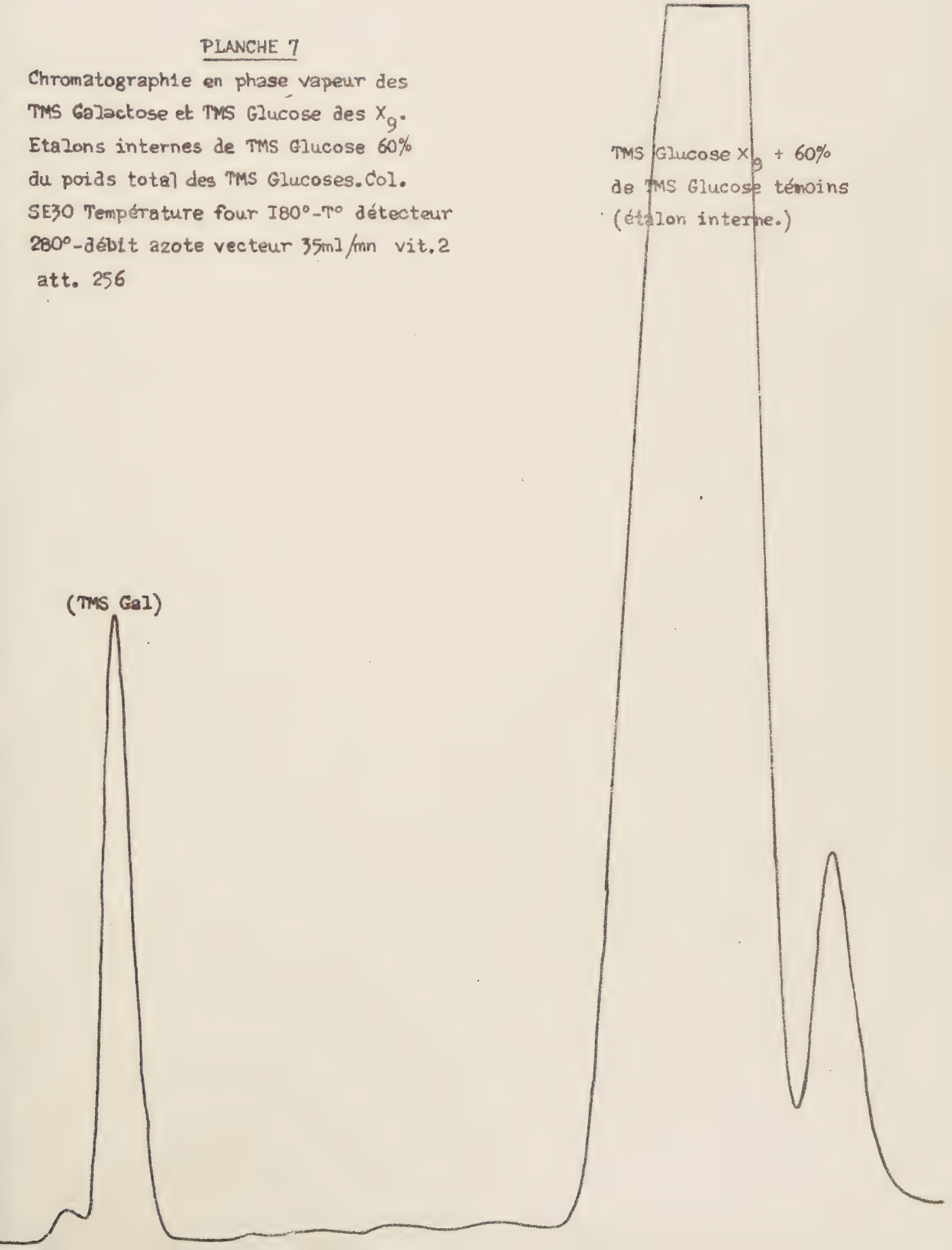
Galactosyl(1-4)-Glucosyl-Monophosphate 6-P-α palmitate-β linoléna-te,diglycéride)

Le poids moléculaire calculé donne PM_2= 1066.

Notons que X_8 est relativement difficile à extraire en entier du moins afin de garder intacte sa molécule. Une extraction trop brutale détruit en partie ces lipides et conduit à une élévation des taux en X_7 et X_8 parallèlement. Mais une extraction trop douce ne permet pas d'isoler ces X_8 : ils sont fortement retenus dans le matériel; les X_6 et les X_7 pourraient être des intermédiaires métaboliques de X_8 . Ce qui parait certain, et découlant d'obser-

PLANCHE 7

Chromatographie en phase vapeur des TMS Galactose et TMS Glucose des X_9. Etalons internes de TMS Glucose 60% du poids total des TMS Glucoses. Col. SE30 Température four I80°-T° détecteur 280°-débit azote vecteur 35ml/mn vit. 2 att. 256



vations précédentes, c'est la grande mobilité des esters phosphates glucidiques. Ceux-ci peuvent facilement s'isomériser, même dans des conditions de test relativement douces. Par exemple les interconversions d'esters 3P en esters 6P s'observent fréquemment si les températures d'expérience varient. Dans les analyses qualitatives et surtout quantitatives de ces lipides, il faut tenir compte de toutes ces conditions afin de rendre les résultats indiscutables.

I. Structures et identifications de X_9.

Les X_9 sont des substances très polaires, et au cours de fractionnements sur colonne ils migrent toujours avec les pigments polaires malgré des purifications successives, ces X_9 restent contaminés par des pigments à l'état de trace. En outre les X_9 sont très fragiles, photolabiles et thermodégradables. Substances quaternaires, ces lipides contiennent une forte teneur en phosphore. La formule brute établie à partir de la composition élémentaire est : (Tableau IV)

$$C_{62}H_{120}C_{43}P_4$$

dont le poids moléculaire est $PM_1 = 1676$.

Par ailleurs analyses et dosages de constituants montrent que les X_9 contiennent outre le glycérol et les acides palmitique et linolénique, une assez forte teneur en esters phosphates de glucose et galactose (Tableau V) Planche 7.

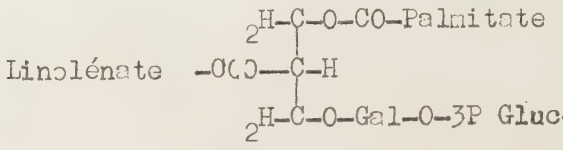
La méthylation et l'hydrolyse ménagée en milieu chlorhydrique de X_9, suivies d'oxydation périodique, permettent de caractériser les 2-3-6 triméthylgalactose, 3P-2-3 diméthylglucose et enfin, les 6P-2-3-4 triméthylgalactose -O-2,3P-6 méthylglucose saccharidiques. D'autres dérivés méthylés sont aussi présents, mais en plus faible quantité et ne sont pas identifiés. Il en résulte que :

1°) Les glucides constitutifs des X_9 sont deux glucose et deux galactose, ces derniers liés par les ponts osidiques 1-4

2°) Les glucose et galactose se succèdent dans l'ordre suivante dans la molécule
diglycéride-Galactose 1- Glucose 2 - Glucose 3-Galactose 4.

3°) Le glucose 3 est diphosphaté en C3 et en C6. Le galactose 4 est monophosphaté en C6, et lié au glucose 3 en 4-1. Le glucose 2 est aussi monophosphaté en C3 et lié en 4-1 au galactose 1. Ce dernier n'est pas phosphaté et est lié par pont osidique en C4- α - au glycérol.

De ces considérations nous proposons pour X_9 la formule suivante :



(Monophosphate, 6P Galactosyl, (I-4)Diphosphate 3.6P Glucosyl,(I-4), monophosphate 3P, Glucosyl,(I-4) Galactosyl, tétraphosphates tétraglycosyl, palmitate, linolénate diglycéride

I ont le poids moléculaire calculé PM_2 = 1714. Le spectre de masse indique 1800. Comparativement les trois valeurs de PM obtenues par des méthodes différentes sont assez éloignées les unes des autres, néanmoins leur écart reste inférieur aux écarts types.

Les extractions de X_9 sont par ailleurs très difficiles à obtenir. Ces substances sont aussi très fragiles, et sans précautions particulières il est impossible de les obtenir dans leur structure intégrale. Par exemple, une hydrolyse trop forte en milieu acide ou à haute température peut entraîner la désorganisation progressive de leur structure. Cette dénaturation est dûe aux interconversions isomériques des esters phosphates les hexoses dans le premier stade de dénaturation. Par chromatographie en phase vapeur des TMS sucres on observe qu'au delà de 100°C les taux de sucres diphosphates esters diminuent rapidement, tandis que ceux des sucres C6 monophosphates augmentent proportionnellement. De même au delà de 100°C les 6P glucose et 6P galactose monophosphates sont plus fréquents que les 3P glucose et galactose. A basse température les 2P et 4P monosaccharides, sont plus labiles en milieu acide que les 3P correspondant. Il n'est donc pas impossible que l'isomérisation se fasse rapidement à partir de 120° C, et l'interprétation des résultats doit donc se faire très prudemment. Ces isomérisations des esters phosphates glucidiques, rendent les molécules de X_9 de plus en plus fragiles, et vulnérables aux attaques nucléophiles, et la destruction de l'intégralité de la molécule se fait très rapidement.

J. Structure et identification des X_{10}-

X_{10} ont été obtenus en trop faible quantité ce qui n'a pas permis l'étude exhaustive de leur structure : il s n'ont pu être identifiés de façon certaine. Nous signalons seulement leur existence dans les trois Fucacées étudiées. Très fortement polaires, élués toujours dans les fractions de queue, ils sont présents dans les solvants de lavage des colonnes. Cette substance est composée de cinq éléments. Soufre et phosphore existent, rendant la caractérisation et la clas-

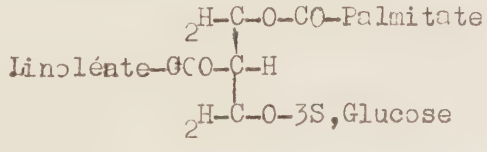
sification des X_{10} très compliquées. Provisoirement nous les avons classés dans les non identifiés.

K. Structures des X_{11} et identifications.

Les $X_{11} \longrightarrow X_{16}$ constituent une série des substances acétono-solubles migrant hors de la colonne dans la fraction désignée par f_2 (cf partie expérimentale). Tous les lipides de cette série contiennent du soufre. Les lipides soufrés sont très peu connus et leur classification récente est encore provisoire. Les premiers lipides soufrés découverts par THUDICHUM (89) en 1870 dans le cerveau, n'avaient pas attirés, semblent-ils les chercheurs jusqu'en 1958. La sulfolipose dans la leucodistrophie métachromatique ayant alors permis de changer l'ordre des choses. Depuis l'étude des sulfolipides évolue rapidement. Actuellement, l'intérêt porté aux membranes constituées de phospho et sulfolipides, la présence d'autres lipides soufrés découverts dans les plantes, les tissus animaux et même les Uni-cellulaires, rendent nécessaire l'étude de ces substances. HAINES (90-92), GOLDBERG (93-94), BENSON (95), STOFFYN (96) etc... furent à l'origine du développement intensif de l'étude des sulfolipides, si longtemps négligés..

Les lipides de nos Fucacées contiennent une quantité relativement importante de sulfolipides. Qualitativement ces sulfolipides présentent une grande diversité moléculaire, la plupart d'entre eux ne figure pas dans la nomenclature actuelle. Ainsi les X_{11} sont en fait un mélange de deux substances de polarités très voisines. Ce sont tous les deux des monosulfates esters glucidiques. Les carbones de l'ose, porteurs du groupe ester sulfate, sont dans la plupart des cas en 3 ou en 4 mais rarement en 6. Ceux-ci sont relativement labiles, ce qui explique aussi leur rareté dans les extraits lipidiques.

L'analyse élémentaire des différentes produits, le dosage des constituants moléculaires permettent d'établir leurs formules respectives. Les résultats des tableaux IV et V font proposer la formule brute : $C_{39}H_{68}O_{11}S$ et de poids moléculaire : $PM_{11} = 744$. La formule semi-développée de X_{11} serait :



(Monosulfate,3S , Glucosyl,(Cl -α), α Palmitate, β Linoléate diglycérides).

Le deuxième isomère des X_{11} que nous désignons par X'_{11} est le

(Mônosulfate 6S Glucosyl, (Cl-α'), α Palmitate, β Linoléate diglycérides).

Les poids moléculaires calculés à partir de ces constituants sont de 919 = PM_2.

l'étude des esters sulfates des glucides de X_{11} nous a permis de retenir certaines conclusions quant à leur structure.

En premier, les glucides constitutifs sont exclusivement du glucose Les différentes techniques analytiques employées n'ont pas révélé d'autres hexoses.

En ce qui concerne l'état du soufre, notons que :

1° L'hydrolyse acide faible donne du sulfate, mais une hydrolyse prolongée n'a pas modifié la teneur en sulfate, préalablement obtenu , donc pas de sulfonate présent.

2° L'analyse spectrale aux IR indique que le groupe ester est en position équatoriale du C3, préférentiellement. Le pic d'absorption est localisé dans la zône 810 cm^{-1}. Toutefois, l'hydrolyse acide à plus de 120°C pendant plusieurs heures, conduit à une augmentation de la teneur en esters C6:celle des esters en C3 diminue progressivement et proportionnellement. Nous pensons que les esters en C6 sont plus stables que les esters sulfates en C3, à haute température. (Spectres I planches 8-3)

3° Les proportions des deux isomères constituants X_{11} sont équilibrées, dans les conditions normales. Cet équilibre est rompu si la température s'élève et le déséquilibre se fait au détriment des C3 sulfates. Cette isomérisation indique probablement l'étape normale du métabolisme de la substance.

Les résultats obtenus confirment la structure proposée ci-dessus pour X11. Cette structure est comparable à celle des 6 déoxy galactosyl sulfonate diglycérides connus. Les X_{11} diffèrent cependant de ces derniers, par la nature de leur glucide qui est le glucose et non le galactose. Par ailleurs dans les deux isomères l'ester est un sulfate et non un sulfonate comme dans le cas des 6 déoxygalactosyl sulfonate diglycérides. Les X_{11} seraient les équivalents de ceux-ci et non leurs homologues de structure.

L. Structures des X_{12} et identification des lipides.

Les X_{12} sont quantitativement les plus abondants de tous les lipides soufrés. De structure identique à celle des X_{11}, mais l'ester sulfonate remplace l'ester sulfate en C6 du galactose. Leur poids

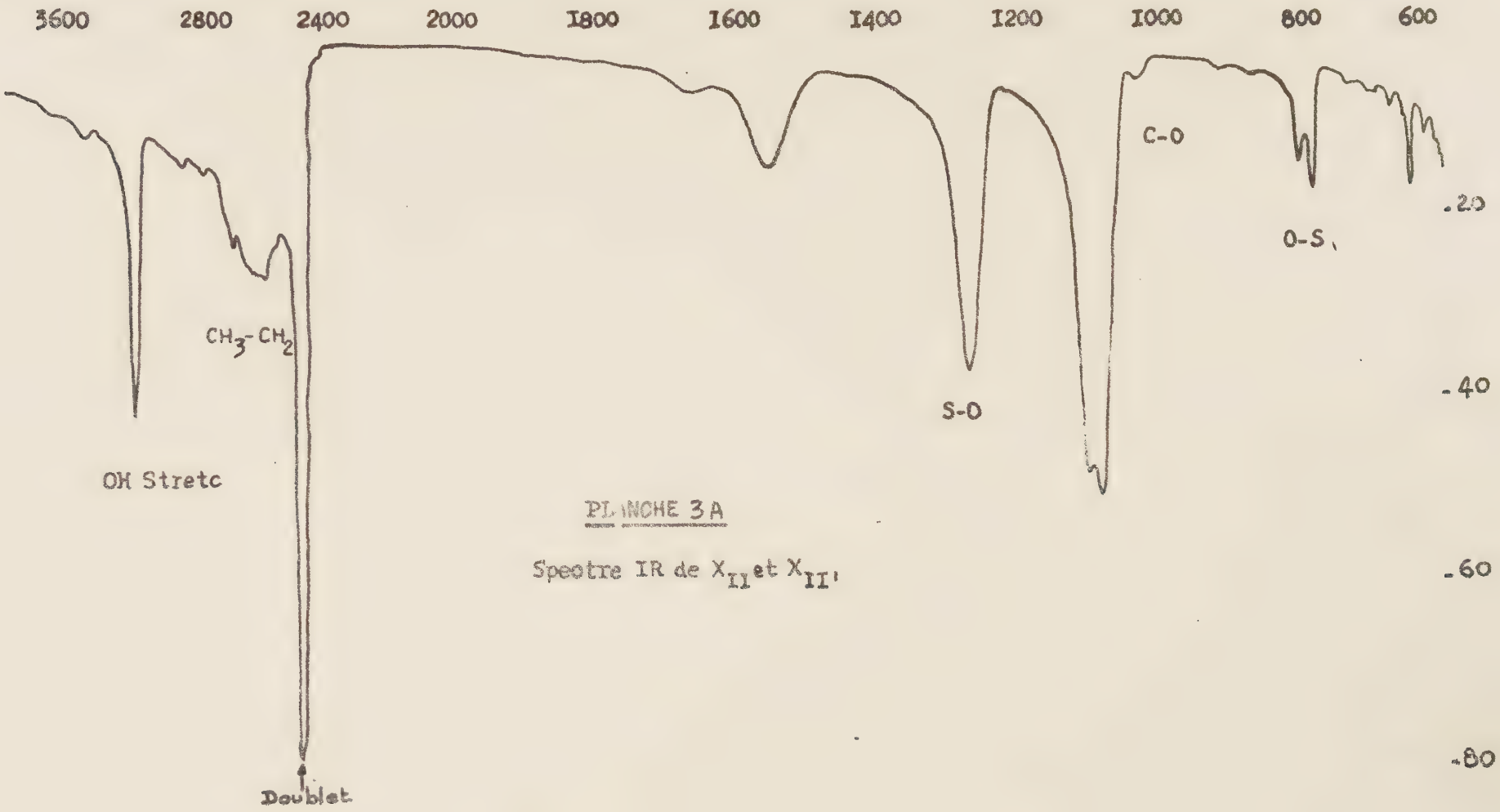


PLANCHE 3A

Spectre IR de X_{II} et $X_{II'}$

PLANCHE 8

Chromatographie en phase vapeur des TMS Glucose des X_{II} et $X_{II'}$, Col. SE30 T° four 180°C-T°détecteur 280°-débit d'azote vecteur 35ml/mn vit 2, att 128.

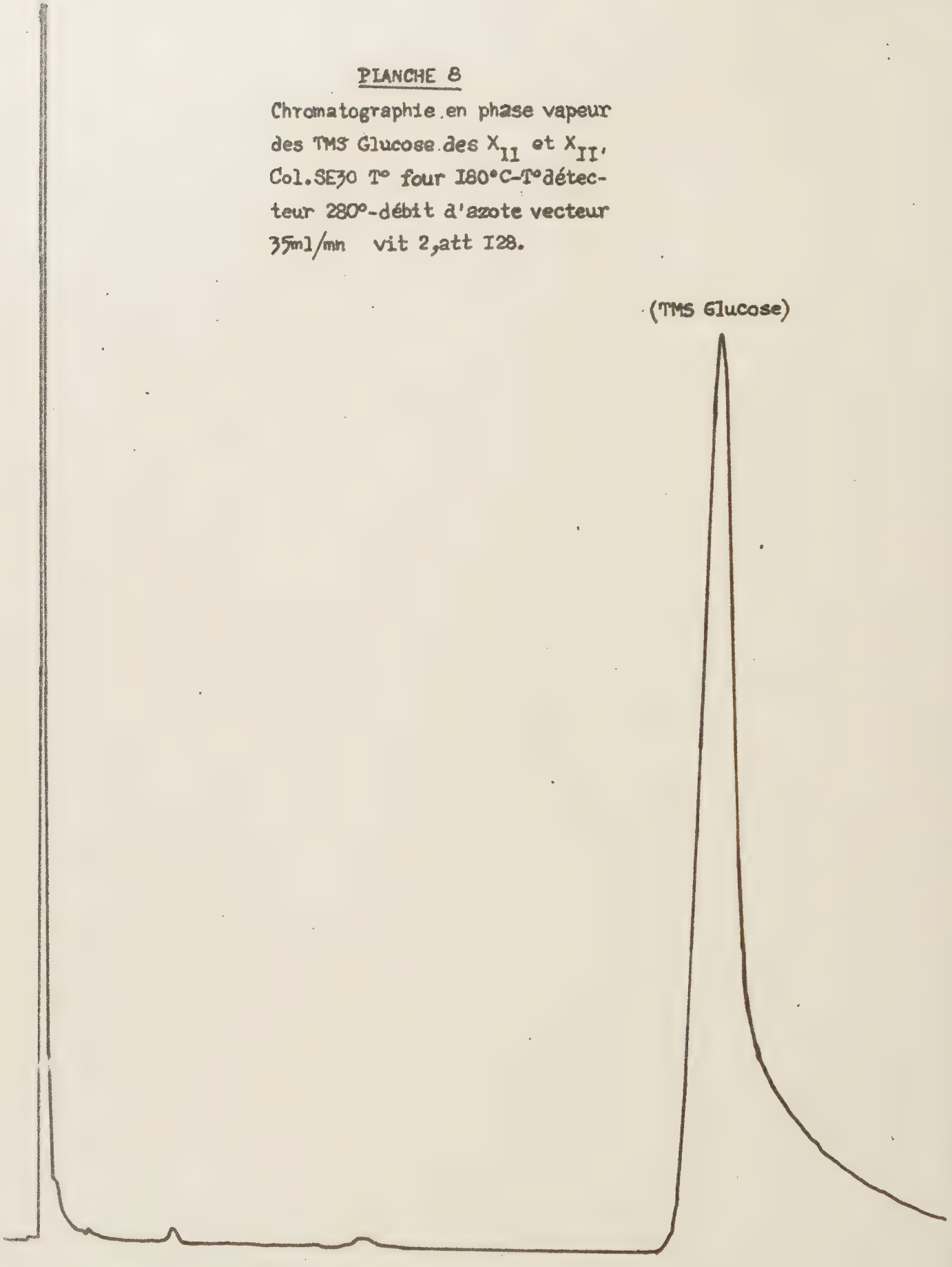
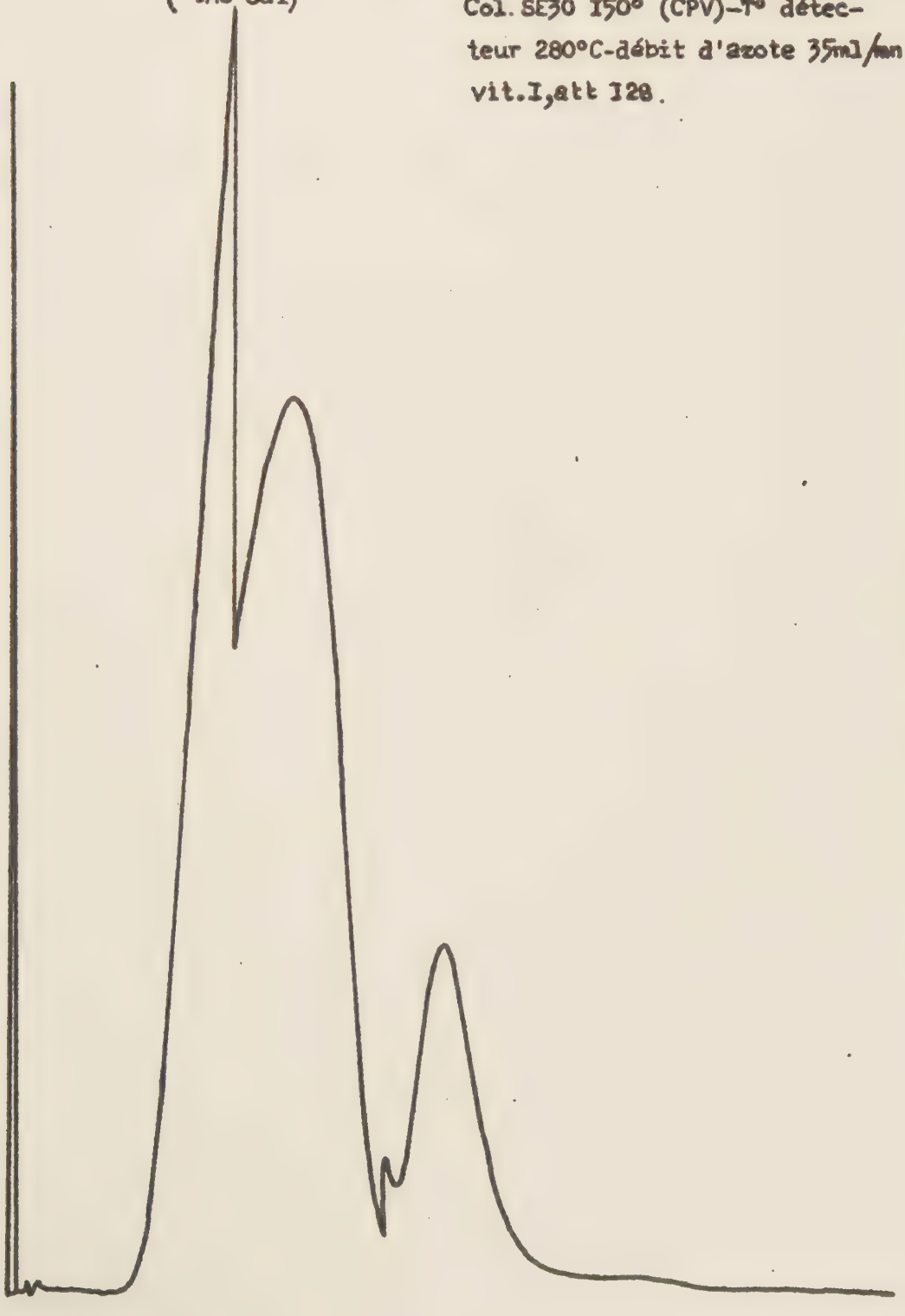
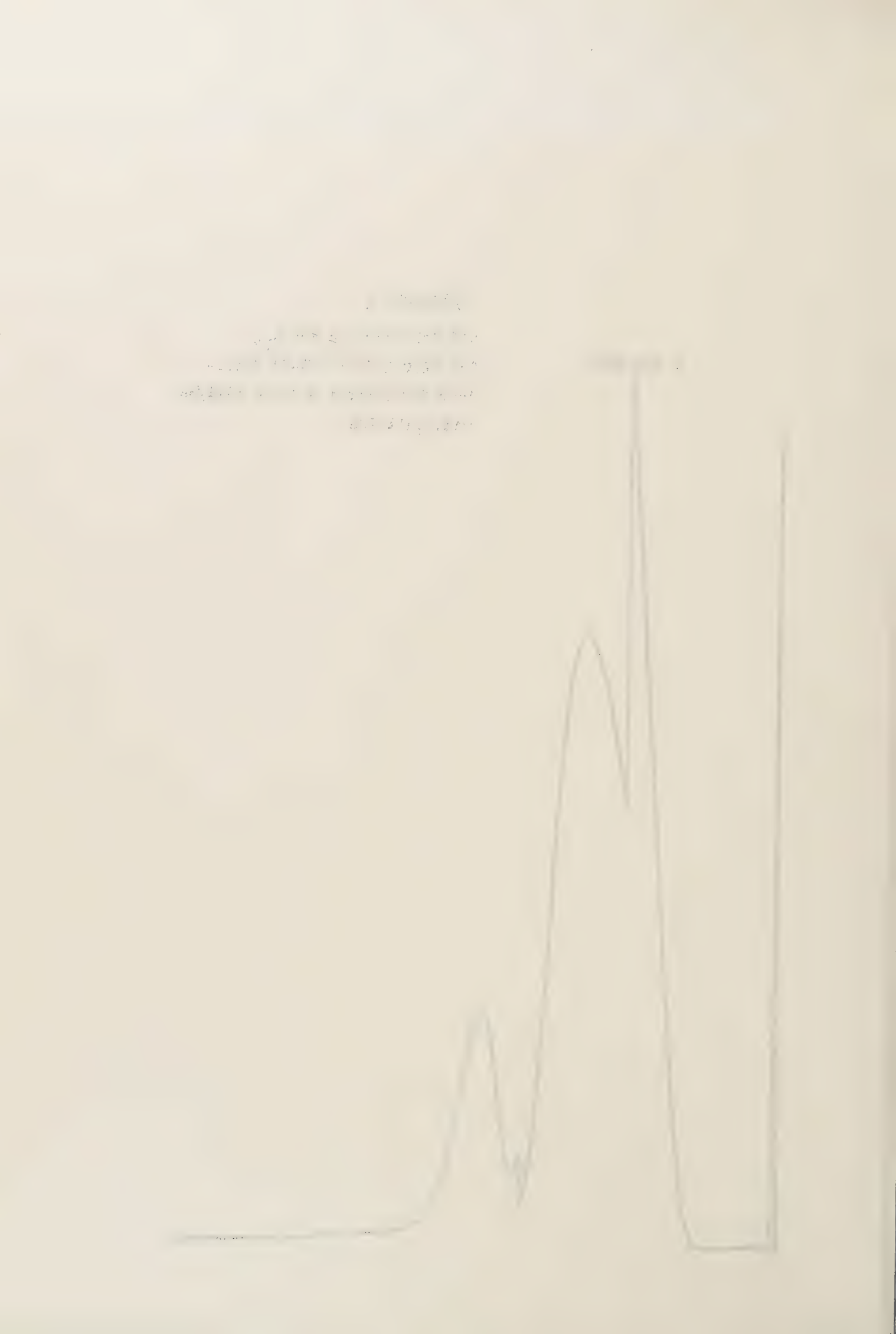


PLANCHE 9

TMS Galactosides des X_{12}
Col. SE30 150° (CPV)-T° détecteur 280°C-débit d'azote 35ml/mn
vit.I,att 128.

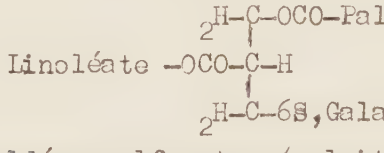




moléculaire correspond aussi à celui des X_{11}. La détermination de la position de l'ester sulfonate fut précisée aux IR, et les sucres constitutifs identifiés étaient le galactose. L'hydrolyse acide à 180°C pendant 18-24 heures libère 5-8% de sulfate. La cinétique hydrolytique indique nettement l'absence des sulfates, ces derniers dans les conditions ci-avant étant libérés totalement en une ou deux heures. Par ailleurs la destruction catalytique en fioles de SCHONIGER (cf. Par tie exp.) a révélé la présence d'environ 10% de soufre total, dans X_{12}. L'hydrolyse acide n'a pas toutefois libéré de sulfates, à 100°C après dix heures de contact. Après 48 heures d'hydrolyse, dans les mêmes conditions de température et de pH, 4,5% de sulfate sont libérés. Ces faits démontrent que le groupe ester de ce sulfolipide est un sulfonate, car l'hypothèse d'un sulfate stable dans les conditions d'hydrolyse ci-dessus ne peut être retenue. Nous pensons qu'il s'agit très vraisemblablement d'un homologue des 6ω déoxy-galactosyl-sulfonate-diglycérides connus. Les restes acyls de X_{12} sont des palmitate et linoléate . Nous proposons donc les formules suivantes : planche 9

1) Formule brute : $C_{39}H_{68}O_{11}S$. Le PM_1 correspondant est évalué à 744

2) Formule semi-développée :



(6S, Galactosyldéoxysulfonate, α palmitate, β linoléate, diglycéride)

M. Structures et identification des X_{13}

Les X_{13} existent en très faible quantité chez Pelvetia canaliculata (L), par contre Fucus serratus (L) possède la plus forte teneur de tous les lipides soufrés présents. Ce lipide est caractérisé par sa richesse en soufre comparé aux autres lipides soufrés, isolés jusqu'à présent. L'analyse élémentaire des X_{13} (tableau IV) a permis d'en proposer la formule brute suivante : $C_{51}H_{90}O_{24}S_3$. Le poids moléculaire déterminé avec la formule brute est PM_1 = 1182. Les constituants de la molécule sont : (tableau V)

- Acide palmitique (20%)
- Acide linoléique (21,85%)
- Glycérol (7,13%)
- Sucres (28,21%)
- Sulfates et sulfonates (22,65%)

Les sucres identifiés sont les glucose et galactose dont le rapport moléculaire relatif est 1. L'hydrolyse douce après méthylation forme les produits suivants :

1° les 2,4 diméthyl glucose, C3, C6 disulfates

2° 2,3 diméthyl galactose C6 sulfonates

Il existe aussi deux ou trois autres corps dans l'hydrolysat, d'importance secondaire, en faible quantité, non identifiés. L'oxydation périodique suivie de l'étude spectrophotométrique aux IR nous permettent d'affirmer que:

a) Glucose et galactose dans la molécule sont liés en 1-4 (par un pont osidique)

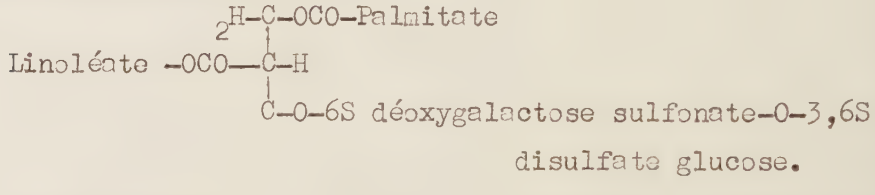
b) les carbones 3 et 6 du glucose sont tous deux estérifiés par des sulfates

c) le carbone 6 du galactose est estérifié par un sulfonate (planches 10A-10B)

Nous proposons ainsi pour les X_{13} les formules suivantes:

A. Formule brute : $C_{51}H_{90}O_{24}S_3$. Le poids moléculaire PM_1 = 1182

B. Formule semi-développée :



Le poids moléculaire calculé à partir de la formule semi développée est PM_2 = 1276. Il s'agit du (3,6S disulfate glucosyl, (1-4),6S Sulfonate-déoxygalactosyl diglucides, palmitate, linoléate, diglycérides.)

N. Structures et identification de X_{14}-

Les X_{14} ne présentent pas les structures classiques des glycérides esters rencontrés jusqu'ici. Comme tous les lipides, les X_{14} sont insolubles dans l'eau, quoique leur solubilité peut être obtenue en solution basique, à diverses concentrations. Ils sont très solubles dans les solvants organiques mais aucune trace d'acides gras n'a été détectée dans ce lipide.

Par chromatographie en phase gazeuse, sur colonne apolaire SE 30 à 10% sur chromosorb et sous forme triméthylsillylée (TMS) après hydrolyse basique par l'hydroxyde de potassium 0,5N, un reste alcool gras est identifié, très probablement en C_{30}. L'indice d'hydroxyle indique

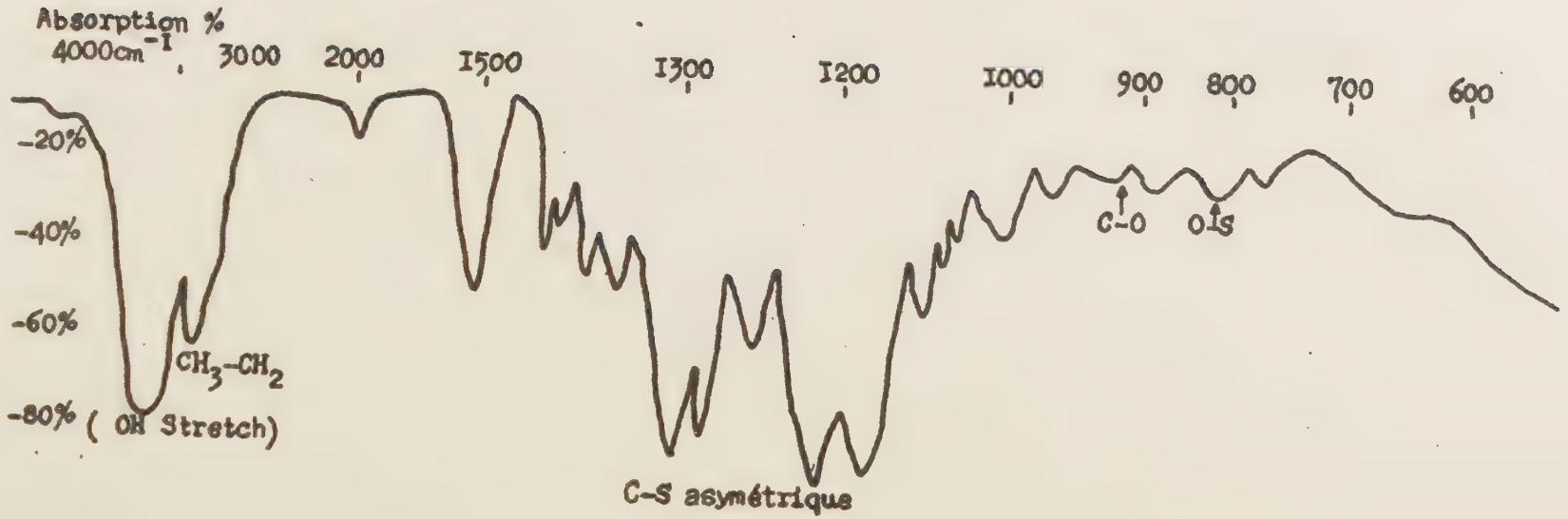
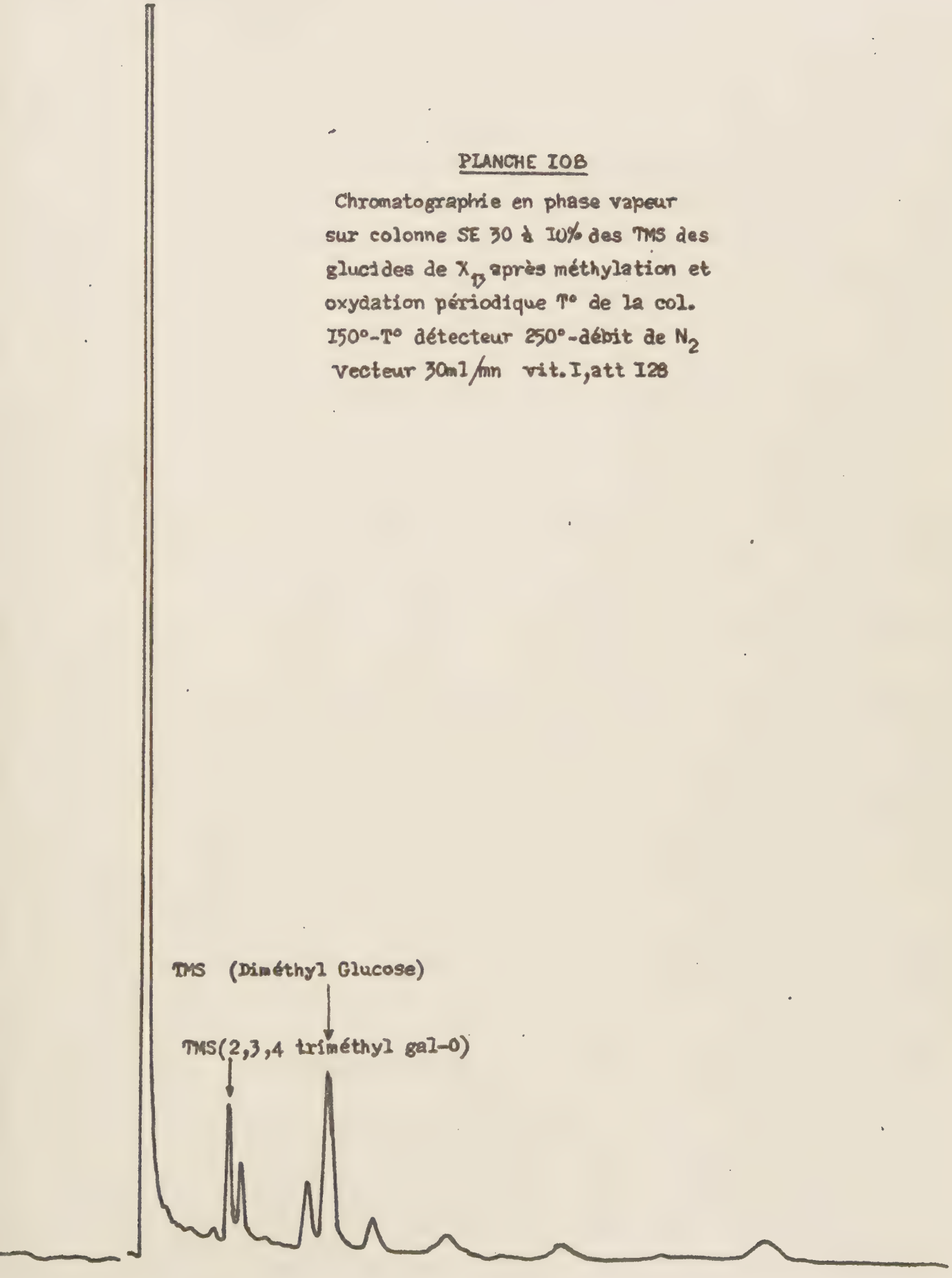


PLANCHE 10A

Spectre IR des X_{13}.

PLANCHE IOB

Chromatographie en phase vapeur sur colonne SE 30 à 10% des TMS des glucides de X_{17} après méthylation et oxydation périodique T° de la col. 150°-T° détecteur 250°-débit de N_2 vecteur 30ml/mn vit.I,att 128



que ce pourrait être un dialcool. Par ailleurs l'indice d'iode, selon plusieurs méthodes différentes, révèle une molécule saturée. Dans l'hydrolysat, les restes sulfates ont été mis en évidence, dans la proportion moléculaire de 1/2 par rapport aux dialcools en C_{30}. Dans tous les échantillons analysés, les alcools monosulfatés sont majoritaires en général. Dans les lots de Pelvetia canaliculata très jeunes nous avons trouvé cependant des C_{30} disulfates en quantité quasi égale aux C_{30} monosulfates.

Les études des spectres de masse réalisés selon la technique de RYHAGE et coll (97) et FRIEDEL et coll (98-99) nous permettent d'affirmer que :

- les monosulfates sont dérivés d'un alcool primaire en C30. La fonction alcool primaire est estérifiée par l'acide sulfurique sans rotation optique de la chaîne aliphatique.
- les disulfates ont un groupe ester en C1 primaire. L'alcool secondaire en C18 de la chaîne aliphatique a été déterminé par la présence des divers fragments provenant du clivage sélectif en Carbone porteur du OH secondaire. Ce clivage se fait en β et le fragment qui contient le OH est particulièrement stable. En outre la présence de C_{17} en grande quantité après clivage confirme le mode de clivage en β de la chaîne.

Enfin les spectres IR des X_{14}, purifiés et entièrement déshydratés au préalable, ont révélé la présence de bandes d'absorption dans la région 926-945 cm^{-1}, caractéristiques des sulfates secondaires, et aussi dans la région 830cm^{-1} des sulfates primaires. Ces analyses démontrent que les X_{14} sont des alcools gras mono ou disulfatés à chaîne linéaire. Les groupements OH du dialcool sont en C1 pour l'alcool primaire et en C18 pour l'alcool secondaire.

Les analyses et dosages élementaires des X_{14} permettent de proposer les formules brutes suivantes: (tableaux IV et V)

1) Disulfates : $C_{30}H_{62}O_4S_2$ dont le poids moléculaire est PM_1= 614
2) Monosulfates : $C_{30}H_{65}O_5S$. Le poids moléculaire des monosulfates est évalué à 503

Les PM obtenus par spectrophotométrie de masse indiquent PM = 635.

Signalons enfin que les X_{14} migrent très lentement sur couches minces de silicagel/silicate de magnésium avec le système de solvant $CHCl_3$/ $MeOH/H_2O$, 65/25/5, (v/v/v). Leur Rf est évalué à 0,28 environ. Avec un solvant plus basique la migration est relativement plus élevée.

Ces lipides comme nous l'avons déjà signalé sont présents en très faible quantité dans la plupart des échantillons analysés et pour les trois espèces d'algues.

Bien que la structure des X_{14} ne soit pas encore parfaitement déterminée nous pouvons suggérer les formules semi-développées suivantes pour les deux constituants des X_{14}

1° X_{14} monosulfate: $CH_3-(CH_2)_{28}-\underset{H}{\overset{H}{C}}-O-SO_3H$

(Alcool C1 monosulfate ester, triacontanol)

2° X_{14} disulfates: $CH_3-(CH_2)_{11}-CHSO_3-(CH_2)_{16}-\underset{H}{\overset{H}{C}}-O-SO_3H$

(Alcool C1,C18,disulfate, triacontanediol) (planches 11-12)

Sous réserve d'étude plus approfondies de structures, les formules proposées ci-dessus nous paraissent conformes aux résultats analytiques obtenus au cours de cette étude.

O. Structures et identifications des X_{15}.

Les études qualitatives et quantitatives de ce lipide, sont particulièrement difficiles car il se trouve en très faible quantité dans tous les échantillons analysés. Dans les meilleurs cas sa teneur peut atteindre 4-4,5% des lipides soufrés totaux. La détermination de la structure de ce lipide est encore imprécise.

Les fractionnements par chromatographie sur colonne et sur couches minces avec les solvants très acides, indiquent une faible migration Les solvants basiques les séparent mieux des autres lipides, mais le Rf reste malgré tout très bas de l'ordre de 0,10-0,15.

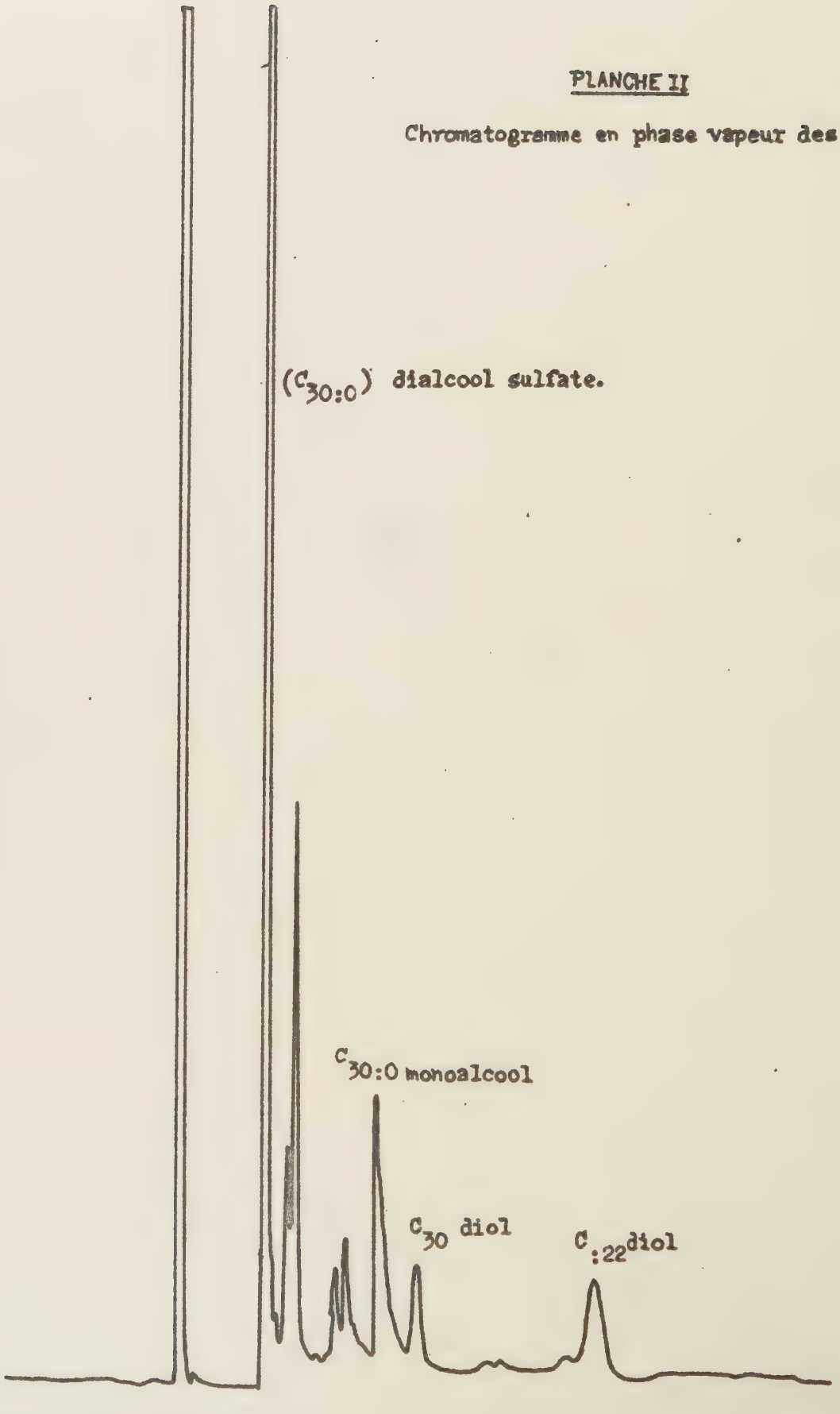
L'analyse élémentaire des X_{15} indique une assez forte teneur en S. La formule brute résultante n'a pas été établie. L'indice d'hydroxyle laisse présager un dialcool, mais l'indice d'iode révèle une faible insaturation de la molécule.

La chromatographie en phase gazeuse sur colonne de SE 30 à 10% sous forme triméthylsillylée, indique une chaîne linéaire soit en C_{18} trans soit en C_{20} monoinsaturée, forme iso.(planches 13-14.Tableaux IV et V)

Les fonctions alcools primaires, déterminées par spectre de masse et IR, sont portées en C_1. Les mêmes méthodes d'études indiquent aussi que les fonctions alcools secondaires pourraient être en position C12 pour les alcools $C_{18:0}$ trans ou C14 pour les $C_{20:1}$ iso. Nous proposons donc pour les X_{14} les formules semi-développées suivantes

PLANCHE II

Chromatogramme en phase vapeur des $X_{I4_{I-2}}$



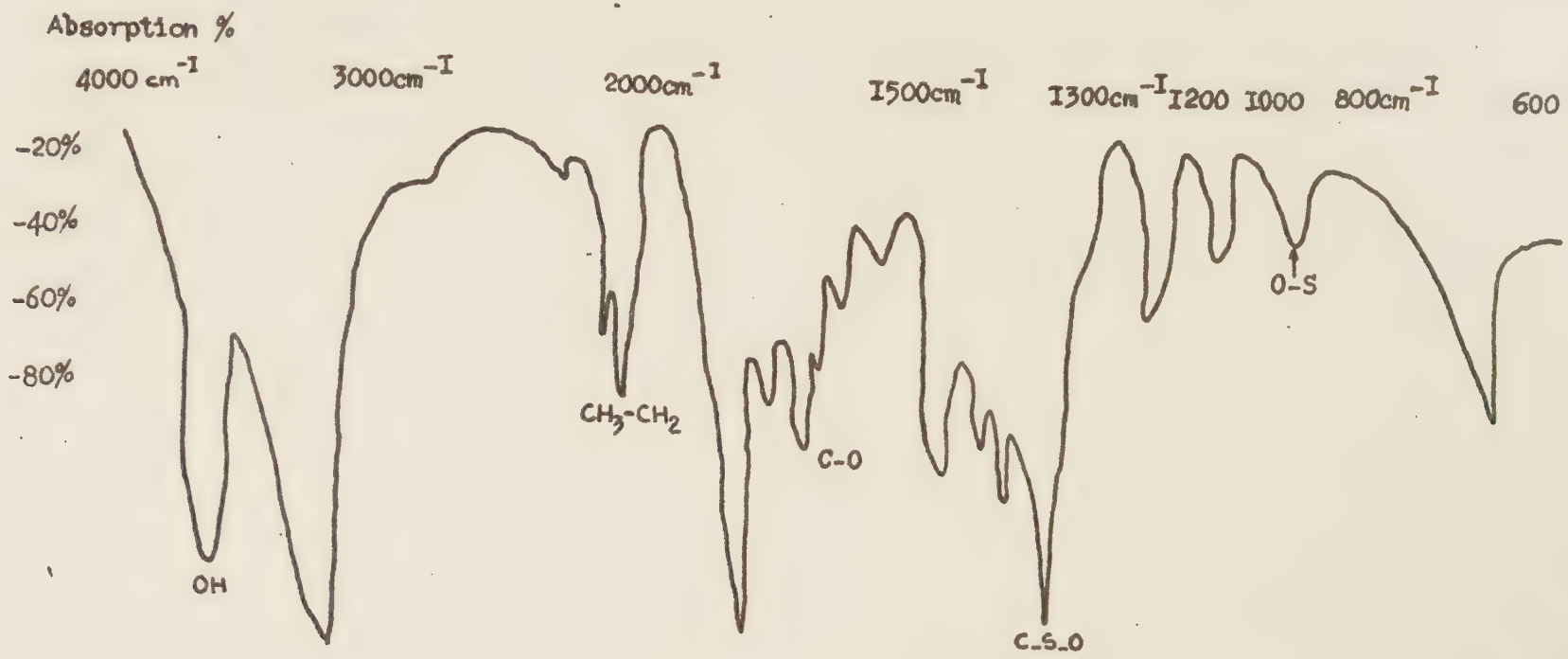
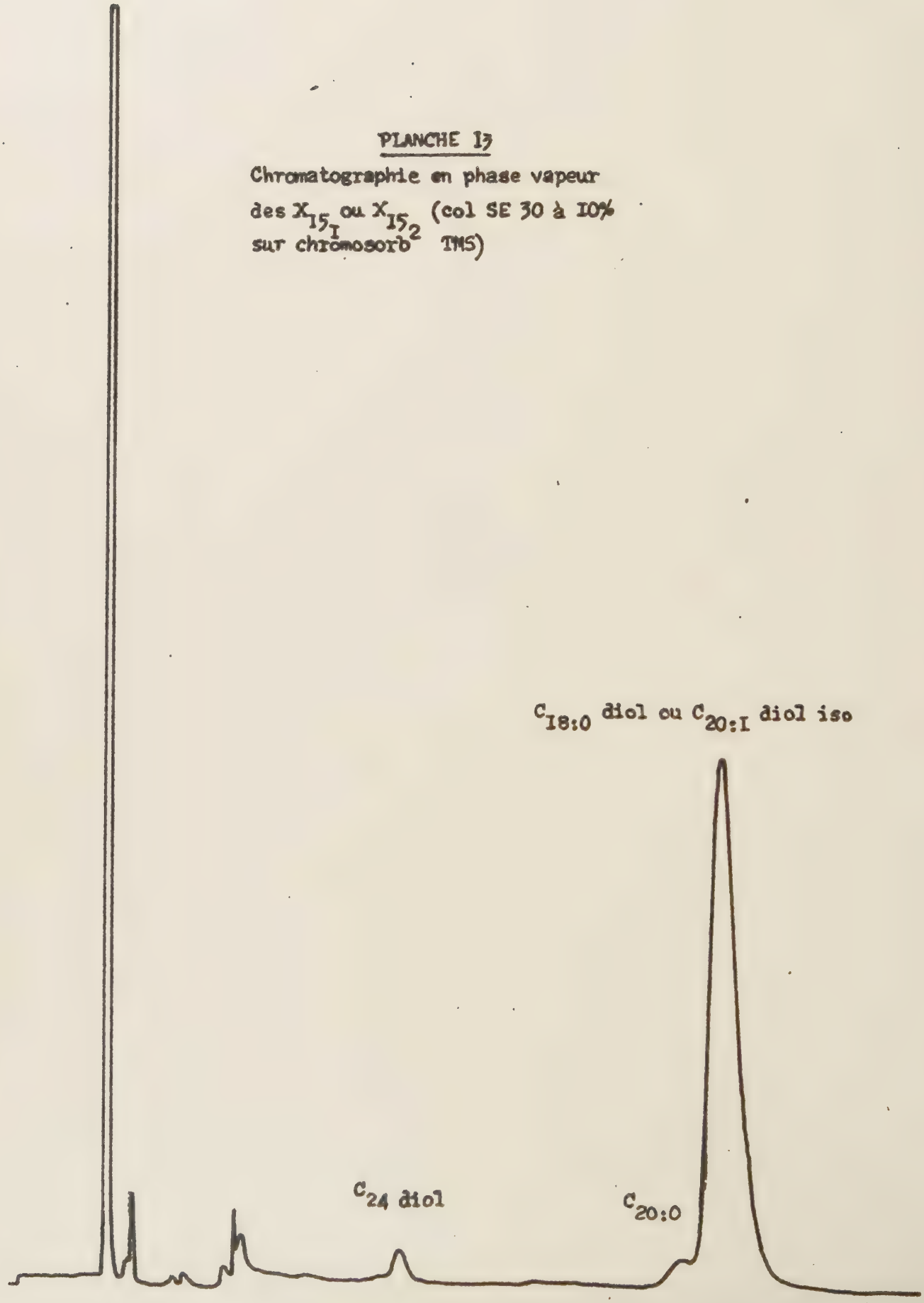


PLANCHE 12

Spectre IR des X_{14} disulfate triacontanol

PLANCHE I3

Chromatographie en phase vapeur des X_{15_1} ou X_{15_2} (col SE 30 à I0% sur chromosorb TMS)



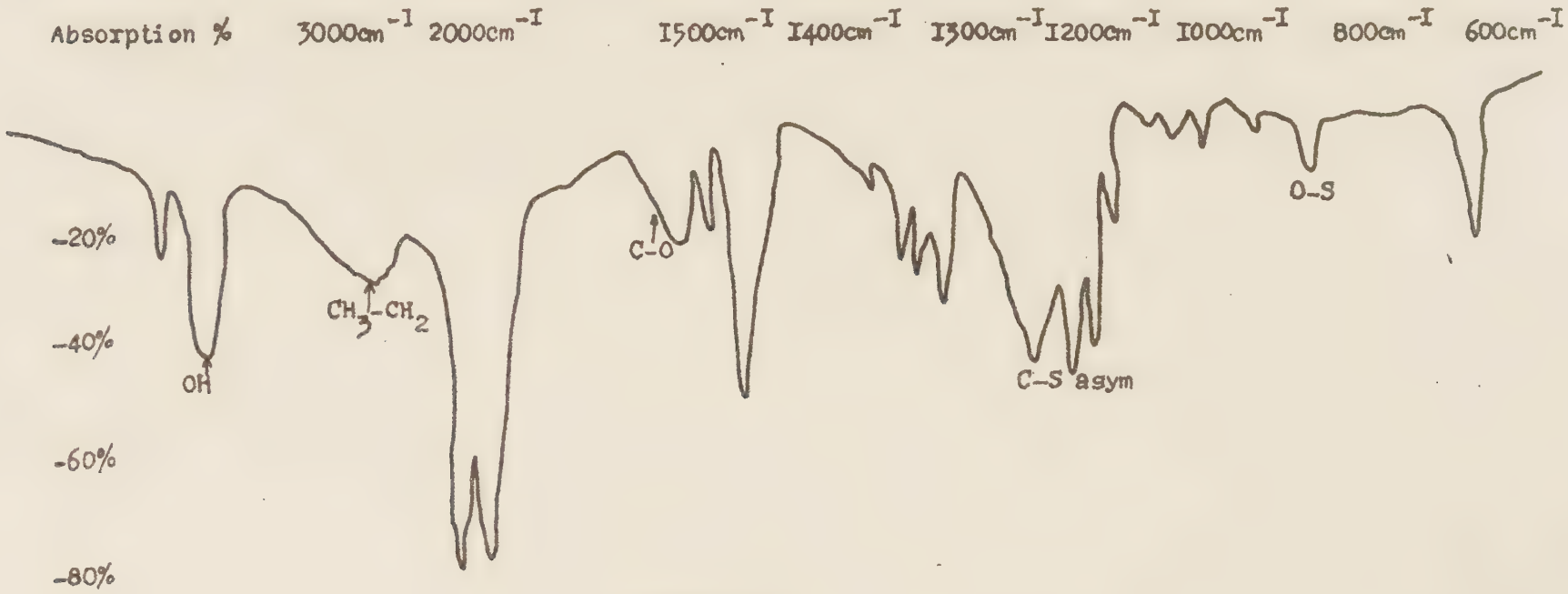


PLANCHE 14

Spectre IR des $X_{15_{I-2}}$ ($C_{18:0}$) disulfate octadécenédiol..

- Formule des $C_{18:0}$: $CH_3-(CH_2)_5-\overset{H}{\underset{O-SO_3H}{C}}-(CH_2)_{10}-\overset{H}{\underset{H}{C}}-O-SO_3H$

(Alcool C_I-SO_4, $C_{12}-SO_4$, disulfate Octadécanédiol, trans. (PM=286) Compte tenu de la faible insaturation de la molécule, il est possible que l'existence de ce type moléculaire de X_{15_I} soit incertaine, ou alors en très faible quantité par rapport au $C_{20:1}$ transqui pourrait être le seul représentant des X_{15} sinon le constituant majoritaire dans le complexe X_{15}. La formule semi-développée du type moléculaire $C_{20:1}$ trans est la suivante:

- Formule des $C_{20:1}$: $CH_3-(CH_2)_5-\overset{H}{\underset{O-SO_3H}{C}}-CH=CH-(CH_2)_{10}-\overset{H}{\underset{H}{C}}-OSO_3H$

La position de la double liaison fut déterminée par clivage oxydatif au périodate après hydroxylation des X_{15} par l'acide performique. Les produits d'hydrolyse sont analysés soit par chromatographie en phase gazeuse sur colonne SE 30 à 10% sur chromosorb à 180°C, soit au spectrophotomètre de masse. Les résultats obtenus indiquent la position en $C_{13}-C_{12}$ de la double liaison comme l'indique la formule semi-développée ci-dessus. Le poids moléculaire correspondant serait 312. Les X_{15} seraient des alcools C_I, C_{14} disulfates, 12 trans, eicosénédiol. Une étude approfondie fera l'objet d'un travail ultérieur pour plus de détail, mais à moins d'erreurs possibles nous pensons que ces formules correspondent aux différents résultats analytiques obtenus.

IV. Conclusions

Aux termes de cette étude des lipides polaires de Pelvetia canaliculata (L) Decn et Thur, nous pouvons d'ores et déjà tirer les conclusions suivantes:

I° Les lipides polaires de Pelvetia canaliculata sont représentés par seize espèces chimiques différentes (tableau récapitulatif VI), répartis en trois groupes principaux.

Le premier groupe réunit tous les lipides phosphorés dont les structures moléculaires rappellent celles des phosphatidyls diglycérides connus à la composition des acides gras près.

Le deuxième groupe est formé de lipides polaires contenant des glucides, ces derniers de nature diverse, peuvent contenir dans leur molécule un ou des esters phosphates. La position de ces esters sur le glucide est caractéristique de chaque lipide de ce groupe et il en est de même de leur nombre. Certains lipides phosphatés ont des structures voisines des glycolipides connus et peuvent être considérés comme leurs homologues de structure. D'autres plus complexes, n'ont pas d'équivalents connus actuellement, certains d'entre eux sont des polyesters phosphates gluci-

diques.

Le troisième groupe rassemble tous les lipides polaires contenant du soufre,soit sous forme d'esters sulfates ou sulfonates,soit les deux en même temps sur une même molécule.Le nombre et les positions des esters sulfates ou sulfonates sur les sucres constitutifs sont déterminés d'un lipide à l'autre.Quelques lipides de ce groupe ont des homologues de structure connus dans la nomenclature actuelle, mais la plupart des lipides de ce groupe 3 est encore inconnue.

2° Pelvetia canaliculata possède un équipement en lipides polaires bien caractéristique représenté par:

- 7-8%/LP_T(ap) de lipides du groupe I,dont les plus abondants sont les X_4 et X_5 (tableaux VII a et VIIb).Les X_2 et X_3 occupent la deuxième place quantitativement,les X_I ont une teneur variable,dépendant des activités métaboliques des algues.
- I3-I5%/LP_T (ap) de lipides polaires du groupe 2.Les X_6,X_7,X_8 sont les plus abondants et occupent à eux trois I0-II% de LP_T (ap).Les X_9 sont représentés par 2,5-3% tandis que les X_{I0} n'ont pas de teneur fixe et leur quantité varie avec l'activité métabolique des algues.
- Le groupe 3 est représenté par 29-32%/LP_T (ap),les X_{I2},X_{II},$X_{II'}$ sont les trois constituants les plus abondants et sont représentés à eux trois par 25-26% des LP_T(ap).Les X_{I3} occupent 2,5-3%, les X_{I4} I-2% et les X_{I5} environ 2% mais cette teneur varie et dépend des activités métaboliques des algues.

  Dans l'ensemble les lipides phosphorés et soufrés de Pelvetia canaliculata sont en majorité des monoesters phosphate et sulfate.Les esters sulfonates sont présents dans certains lipides mais en quantité relativement faible par rapport aux esters sulfates.Les polyesters sulfates et phosphates existent aussi chez Pelvetia canaliculata mais ils sont minoritaires en général et sont faiblement représentés en comparaison avecles monoesters sulfates et phosphates.

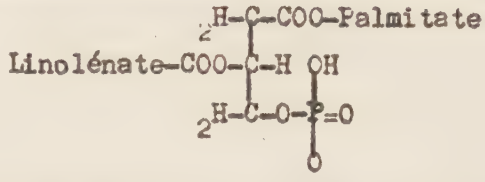
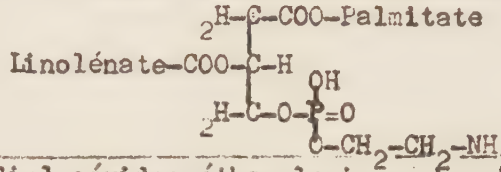
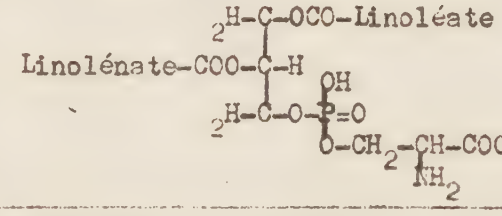
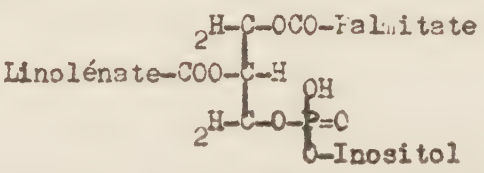
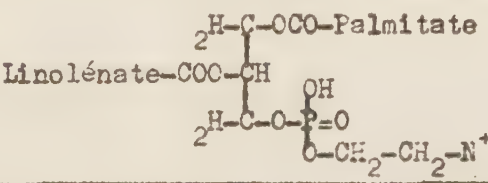
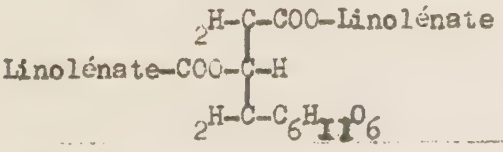
3° Les acides gras constitutifs des lipides polaires de Pelvetia canaliculata sont potentiellement saturés,le rapport des AGS/AGIS sont de l'ordre de 0,42-0,45 en général.

En résumé, les caractéristiques de l'équipement lipidique de Pelvetia canaliculata sont les suivantes:

- Prédominance des sulfolipides totaux par rapport aux phospholipides totaux,ceci est compatible avec les conditions écologiques de l'habitat de cette espèce.
- Majorité des lipides monoesters sulfates et phosphates,les polyesters sulfates et phosphates sont présents en faible quantité

TABLEAU VI

Classification et homologation des I6 lipides polaires trouvés chez les Pelvetia canaliculata(L) Decn et Thur.

Lipides	P.M	Formules brutes	Formules semi- développées	Homologations
X_I	$P.M_1=654$ $P.M_2=706$ $P.M_3=685$	$C_{36}H_{63}O_8P$		Acide phosphatidique.
X_I=(Phosphatidyl, α palmitate, β linolénate diglycéride, acide.)				
X_2	$P.M_1=691$ $P.M_2=750$ $P.M_3=768$	$C_{38}H_{76}O_8PN$		Phosphatidyl-éthanolamine.
X_2=(α palmitate, β linolénate, diglycérides, éthanolamines-phosphatides.)				
X_3	$P.M_1=766$ $P.M_2=818$ $P.M_3=750$	$C_{43}H_{73}O_9PN$		Phosphatidyl-sérine.
X_3=(α linoléate, β linolénate, diglycérides, sérine phosphatides.)				
X_4	$P.M_1=792$ $P.M_2=976$ $P.M_3=840$	$C_{43}H_{69}O_{11}P$		Phosphatidyl-inositol.
X_4=(α Palmitate, β linolénate, diglycérides, inositol-phosphatides.)				
X_5	$P.M_1=744$ $P.M_2=793$ $P.M_3=710$	$C_{41}H_{79}O_8NP$		Phosphatidyl-choline.
X_5=(α Palmitate, β linolénate, diglycérides, choline phosphatides.)				
X_{6I}	$P.M_1=818$ $P.M_2=792$ $P.M_3=919$	$C_{49}H_{70}O_{10}$		Monoglucosyl-diglycérides.
X_{6_I}=(Monoglucosyl, α β dilinolénates, diglycérides ⟶ Ier type moléculaire.)				

Lipides	P.M	Formules brutes	Formules semi-développées	Homologations
X_{6_2}	$P.M_1$=818 $P.M_2$=792 $P.M_3$=919	$C_{49}H_{70}O_{10}$	$^{2}H-C-COO-$linoléate Linolénate-COO-C-H $^{2}H-C-O-C_6H_{11}O_5$	Monoglucosyl-diglycérides.

(X_{6_2} = Monoglucosyl, ∝linoléate, βlinolénate, diglycérides ⟶ 2ème type moléculaire.)

X_{6_3}	$P.M_1$=818 $P.M_2$=792 $P.M_3$=919	$C_{49}H_{70}O_{10}$	$^{2}H-C-COO-$Palmitate Linolénate-COO-C-H $^{2}H-C-C_6H_{11}O_5$	

(X_{6_3} = Monoglucosyl, ∝palmitate, βlinolénate, diglycérides ⟶ 3ème type moléculaire.)

X_{7_1}	$P.M_1$=928 $P.M_2$=879 $P.M_3$=858	$C_{48}H_{96}O_{16}$	$^{2}H-C-COO-$Linolénate Linolénate-COO-C-H $^{2}H-C-O-$Gluc(I-4)Gal.	Diglycosyl-diglycérides.

(X_{7_1} = Monoglucosyl(I-4)monogalactosyl, ∝,βdilinolénate, diglycérides ⟶ Ier type moléc.)

X_{7_2}	$P.M_1$=928 $P.M_2$=879 $P.M_3$=858	$C_{48}H_{96}O_{16}$	$^{2}H-C-COO-$Linoléate Linolénate-COO-C-H $^{2}H-C-O-$Gluc(I-4)Gal.	Diglycosyl-diglycérides.

(X_{7_2} = Monoglucosyl(I-4), monogalactosyl, ∝linoléate, βlinolénate, diglycérides ⟶ 2è type)

X_{7_3}	$P.M_1$=928 $P.M_2$=879 $P.M_3$=858	$C_{48}H_{96}O_{16}$	$^{2}H-C-COO-$Palmitate Linolénate-COO-C-H $^{2}H-C-O-$Gluc(I-4)Gal.	Diglycosyl-diglycérides.

(X_{7_3} = Monoglucosyl(I-4), monogalactosyl, ∝palmitate, βlinolénate, diglycérides ⟶ 3è type)

X_8	$P.M_1$=968 $P.M_2$=1066 $P.M_3$=940	$C_{47}H_{85}O_{18}P$	$^{2}H-C-COO-$Palmitate Linolénate-COO-C-H $^{2}H-C-O-$Glucosyl 6P (I-4)-Gal.	Diglycosyl-monophosphate, diglycérides.

(X_8 = Monophosphate, 6P Monoglucosyl(I-4), Galactosyl, ∝palmitate, βlinolénate, diglycérides, diglycosides.)

X_9	$P.M_1$=1676 $P.M_2$=1714 $P.M_3$=1800	$C_{62}H_{120}O_{43}P_4$	$^{2}H-C-COO-$Palmitate Linolénate-COO-C-H $^{2}H-C-O-$Gal-O-3P, Gluc-O-3.6P, Gluc-O-3P, Gal.	Tétraglycosyl, tétraphosphate diglycérides.

(X_9 = Monophosphate, 3P Galactosyl, (I-4) Diphosphates 3.6P Glucosyl, (I-4) Monophosphate, 3P Glucosyl, (I-4) Galactosyl, tétra phosphates, tétraglycosyl, ∝palmitate, βlinolénate diglycérides.)

X_{10} ⟶	Lipides soufrés et phosphatés à cinq éléments dont C, H, O, P, S. Ces substances sont très fortement polaires de structure complexe, et ne sont pas identifiées actuellement.

Lipides	P.M	Formules brutes	Formules semi-développées	Homologations
X_{II}	$P.M_1$=744 $P.M_2$=819 $P.M_3$=825	$C_{39}H_{68}O_{II}S$	^{2}H-C-COO-Palmitate Linoléate-COO-C-H ^{2}H-C-O-3S,Glucose	Monoglucosyl-monophosphate diglycéride.
(X_{II}= Monosulfate,3S Monoglucosyl,∝ palmitate, β linoléate,diglycérides)				
$X_{II'}$	$P.M_1$=744 $P.M_2$=819 $P.M_3$=825	$C_{39}H_{68}O_{II}S$	^{2}H-C-COO-Palmitate Linoléate-COO-C-H ^{2}H-C-O-6S.Glucose	Monoglucosyl-monophosphate diglycéride.
($X_{II'}$= Monosulfate,6S Monoglucosyl,∝ palmitate, β linoléate,diglycérides)				
X_{I2}	$P.M_1$=744 $P.M_2$=825 $P.M_3$=840	$C_{39}H_{68}O_{II}S$	^{2}H-C-COO-Palmitate Linoléate-COO-C-H ^{2}H-C-6S,Galactose-sulfonate	Monodéoxy galactosyl,monosulfonate diglycérides
(X_{I2}= 6 déoxy galactose sulfonate,monogalactosyl,∝ palmitate, β linoléate,diglycérides.)				
X_{I3}	$P.M_1$=1182 $P.M_2$=1276 $P.M_3$=1089	$C_{5I}H_{90}O_{24}S_3$	^{2}H-C-COO-Palmitate Linoléate-COO-C-H ^{2}H-C-O-6S déoxygalactose,sulfonate-O-3.6S Glucose.)	Gal-sulfonate, disulfate gluc diglycérides.
(X_{13}=6 déoxy-galactosyl sulfonate,6 sulfonate, 3 sulfate monoglucosyl diesters, palmitate, linoléate, diglycérides, disaccharides.)				
X_{I4_I}	$P.M_1$=614 $P.M_2$= - $P.M_3$=635	$C_{30}H_{62}O_4S_2$	$CH_3-(CH_2)_{II}-CHOH-(CH_2)_{I6}-\underset{H}{\overset{H}{C}}-O-SO_3H$	
(X_{I4_I} = Alcool C_I,C_{I8},disulfate,triacontanediol).				
X_{I4_2}	$P.M_1$=503	$C_{30}H_{65}O_5S$	$CH_3-(CH_2)_{28}-\underset{H}{\overset{R}{C}}-O-SO_3H$	
(X_{I4_2} = Alcool C_I monosulfate ester,triacontanol)				
X_{I5_I}	$P.M_1$=286 $P.M_2$=312	-	$CH_3-(CH_2)_5-\underset{O-SO_3H}{\overset{H}{C}}-(CH_2)_{I0}-\underset{H}{\overset{H}{C}}-O-SO_3H$	
(X_{I5_I} = Alcool C_I,C_{I2} disulfate,octadécanédiol)				
X_{I5_2}	$P.M_1$= 296 $P.M_2$= -		$CH_3-(CH_2)_5-\underset{C-SO_3H}{\overset{H}{C}}-CH=CH-(CH_2)_{I0}-\underset{H}{\overset{H}{C}}-OSO_3H$	
(X_{I5_2} = Alcool C_I,C_{I4} disulfates Δ^{I2-I3} ,eicosénediol)				

TABLEAU VII a

Teneur et composition des lipides polaires
des trois Fucacées étudiées (Profil synoptique des LP)

Espèces		Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux (LP_T)		
Lipides		Pelvetia canaliculata	Fucus vesiculosus	Fucus serratus
Lipides phosphorés totaux — Groupe 1	X_1	0,50-1,00	1-1,5	1-2
	X_2	0,50-1,25	0,5-1	2-2,5
	X_3	1,00-1,50	1-2	1-2
	X_4	1,50-2,00	1-1,50	1-1,50
	X_5	2,00-2,75	2,5-3	3-3,50
Lipides phosphorés totaux — Groupe 2	X_6	2,25-2,50	2,5-3,3	0,5-1
	X_7	2,00-3,50	3-5,50	0,8-1,5
	X_8	3,00-5,00	4-6,50	1-2,50
	X_9	1,00-2,50	0,00	14-16
	X_{10}	1,00-2,00	1-2,00	1-2,00
Lipides soufrés totaux — Groupe 3	X_{11}	2,00-2,50	2,2-2,5	1-1,50
	$X_{11'}$	2,00-3,00	4-5	0,5-1,00
	X_{12}	18,0-20,0	12-14	1-2
	X_{13}	2,00-3,00	0,8-1,0	8-10
	X_{14}	1,00-2,00	0,5-1,0	2-2,50
	X_{15}	1,00-2,00	1-1,50	1-1,50
		Poids par 100grammes de lipides totaux (ap)		
	LP_T	15,0-20,0	21-23,5	24-26
		Poids par 100grammes de lipides polaires totaux (ap)		
	PL_T	20,0-23,0	23-26	29-34
	SL_T	32,0-36,0	23-25	16-18
	GpeI	7,00-8,00	7-9	9-11
	Gpe2	13,0-15,0	16-17	20-23
	Gpe3	29,0-32,0	23-25	16-18

Nota LP_T= Lipides polaires totaux - PL_T= phospholipides totaux (GpeI+Gpe2)
SL_T= Sulfolipides totaux - (ap)=avec pigments polaires totaux
(Voir bibliographies (8),PHAM-QUANG-LIEM,PAQUOT C.,LAUR M.H.-RFCG,1970,17)

TABLEAU VIIb

Résumé synoptique des équipements en lipides polaires des trois Fucacées choisies et leurs caractéristiques principales.

Caractéristiques		Espèces: Pelv. canaliculata	Fucus vesiculosus	Fucus serratus
AGS/AGIS	LP_T	0,42-0,45	0,40-0,42	0,34-0,36
	LP_T Gr.I	0,45-0,48	0,43-0,45	0,38-0,40
	LP_T Gr.2	0,38-0,42	0,34-0,36	0,20-0,22
	LP_T Gr.3	0,35-0,36	0,30-0,31	0,24-0,26
Rapport moléculaires	PL_T/SL_T	0,71-0,85	1,00-1,04	1,81-1,88
	Gr2/Gr3	0,47-0,48	0,68-0,69	1,25-1,27
GrI Série I		X_I	X_I	X_I
GrI Série 2	Majoritaires	X_4-X_5	X_3-X_5	X_2-X_5
	Minoritaires	X_3-X_2	X_2-X_4	X_3-X_4
Gr2 Série I		X_{I0}	X_{I0}	X_{I0}
Gr2 Série 2	Majoritaires	X_8-X_7-X_6	X_8-X_7-X_6	X_9
	Minoritaires	X_9	--	X_8-X_7-X_6
Gr3 Série I		X_{I5}	X_{I5}	X_{I5}
Gr3 Série 2	Majoritaires	X_{I2}-X_{II}-$X_{II'}$	X_{I2}-X_{II}-$X_{II'}$	X_{I3}-X_{I4}
	Minoritaires	X_{I3}-X_{I4}	X_{I3}-X_{I4}	X_{I2}-X_{II}-$X_{II'}$
Rapports de proportions moléculaires	MonoP/PolyP du Gr2	3,62-4,40	I5-I5,30	0,I6-0,3I
	MonoS/PolyS du Gr3	5,I0-7,30	I0,7-I2,0	0,25-0,36

Nota. AGS/AGIS= Rapport des proportions moléculaires des acides gras saturés et des acides gras insaturés.

LP_T=Lipides polaires totaux — PL_T=Phospholipides totaux

SL_T=Sulfolipides totaux — MonoP=Monoesters phosphates lipides

MonoS=Monoesters sulfates lipides — PolyP=Polyesters phosphates lipides

PolyS=Polyesters sulfates lipides

par rapport aux monoesters.

- Saturation potentielle des acides gras des lipides polaires totaux mais pour les trois groupes de lipides cette saturation potentielle varie d'un groupe à l'autre et dépend entre autres de la lumière que les algues peuvent recevoir qualitativement et quantitativement.

V. Etudes comparatives des lipides polaires de Fucus vesiculosus et Fucus serratus par rapport à ceux des Pelvetia canaliculata.

Fucus vesiculosus et Fucus serratus ont des habitats différents les conditions écologiques ne sont donc pas les mêmes. Les Fucus vesiculosus ont un habitat [illegible] voisin de celui des Pelvetia canaliculata et leurs conditions écologiques sont corrélativement proches les unes des autres. Les Fucus serratus ont au contraire un habitat éloigné des algues précédentes et leurs conditions écologiques ne sont pas les mêmes. Il importe de vérifier si les équipements en lipides polaires de Fucus vesiculosus et Fucus serratus diffèrent entre eux et aussi par rapport à ceux des Pelvetia canaliculata.

Les comparaisons portent sur les trois valeurs suivantes:

1) Structures
2) Compositions et teneurs
3) Degré de saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires totaux ainsi que des divers groupes.

A. Structures, compositions et teneur des lipides polaires de Fucus vesiculosus (L).

I° Structure et composition.

Les lipides polaires de Fucus vesiculosus sont représentés par quinze constituants principaux dont:

a) Tous les lipides polaires du premier groupe sont présents, chez Fucus vesiculosus, leurs structures sont comparables à celles des lipides de Pelvetia canaliculata, sauf en ce qui concerne la composition en acides gras. Leur poids moléculaire se correspondent aussi aux erreurs d'expérience près.

b) Dans le deuxième groupe nous avons isolé aussi les mêmes lipides polaires que ceux trouvés chez Pelvetia canaliculata, à l'exception des X_9. Ces derniers ne sont pas représentés chez les Fucus vesiculosus sinon à l'état de trace.

c) Enfin le troisième groupe des lipides polaires de Pelvetia canaliculata est aussi bien représenté chez les Fucus vesiculosus. On y retrouve tous les composés de ce groupe, de même structure et de (PM) poids moléculaire du même ordre de grandeur.

d) En ce qui concerne les acides gras des lipides nous avons noté:

une faible insaturation potentielle des acides gras des lipides du groupe I.Le groupe 2 contient des acides gras potentiellement plus insaturés que leurs homologues de Pelvetia canaliculata,le rapport AGS/AGIS est évalué à 0,36 contre 0,38 pour les lipides du groupe 2 de Pelvetia canaliculata.Les acides gras des lipides du groupe 3 de Fucus vesiculosus sont en général plus insaturés que ceux des deux premiers groupes,le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,3I.Par rapport aux acides gras de leurs homologues de Pelvetia canaliculata, les acides gras du groupe 3 de Fucus vesiculosus sont légèrement plus insaturés potentiellement.

2° Teneurs en lipides polaires des trois groupes.

Chez Fucus vesiculosus,les lipides polaires du groupe I occupent 7,5-8% des lipides polaires totaux (ap),(tableaux VIIa et VIIb). Les X_5,X_4 et X_3 sont les plus abondants,ils représentent ensemble 6-8% des lipides polaires totaux,les X_2,I-I,2% et les X_1,I-I,5% suivant les échantillons,leurs variations dépendent des activités métaboliques des thalles.

Le groupe 2 réunit I6-I7% des lipides polaires totaux;les X_6,X_7,X_8 représentent I4-I5% des lipides polaires totaux,les X_{10}: I-2%,les X_9 sont absents [illegible] de Fucus vesiculosus.

Le groupe 3 totalise 23-25% des lipides polaires totaux,il constitue le groupe le plus important qualitativement et quantitativement pour Fucus vesiculosus.Les X_{I2},X_{II},$X_{II'}$ sont les plus importants dans ce groupe et représentent 2I-22% des lipides polaires totaux (ap).Les X_{I3} occupent 0,80-I%,les X_{I4} I-I,5% et les X_{I5} I-I,2% selon les échantillons,la teneur en X_{I5} de ces derniers varie avec les activités métaboliques des thalles.L'équipement en lipides polaires de Fucus vesiculosus présente les caractéristiques suivantes:

- Acides gras constitutifs potentiellement peu saturés,le rapport AGS/AGIS est voisin de 0,40-0,4I pour l'ensemble des lipides polaires de l'espèce.
- Prédominance de monoesters sulfates et phosphates.Les polyesters sulfates et phosphates sont présents mais en plus faible quantité que les monoesters.
- Les sulfolipides totaux sont relativement plus abondants que les phospholipides totaux, [illegible]
- Abondance des X_9 sauf pour de rares exceptions.

B. Structures,compositions et teneurs en lipides polaires de Fucus serratus (L).

I° Structures et compositions.

Les lipides polaires de Fucus serratus sont représentés par

I8-20 constituants principaux.Les I6 lipides de Pelvetia canaliculata sont tous présents chez les Fucus serratus,mais en plus de ces constituants communs aux trois algues étudiées,nous avons trouvé chez Fucus serratus 2-4 constituants spécifiques de cette espèce.Ces derniers sont soufrés pour la plupart,et le taux EN soufre de ces molécules est souvent élevé.Les analyses et dosages élémentaires ont permis d'établir un PM moyen compris entre 350 et 450. Ces molécules de taille relativement petite,peuvent toutefois contenir 3 à 5 atomes de soufre.Les acides gras ne font pas partie de ces molécules,les glucides non plus, sauf pour deux d'entre eux qui pourraient être des glycosyl polysulfates diglycérides,à faible teneur en glucides.Ces sulfolipides de structure assez particulière trouvés uniquement chez Fucus serratus en quantité non négligeable,sont en plus très polaires et particulièrement très ioniques.Par la chromatographie sur colonne de Florisil ou sur couches minces de Silicagel/Silicate de Magnésium I/I et avec le système de solvant $CHCl_3$/MeOH/Acide acétique 65/25/5 (v/v/v),leur migration est encore très lente,les Rf ne dépassant pas 0,I0-0,I5 pour l'ensemble de ces lipides.Nous signalons ici leur présence,leur identification fait l'objet d'un travail en cours.Les lipides polaires de Fucus serratus sont structuralement comparables à ceux des deux autres espèces,seules les compositions en acides gras diffèrent;ceux des lipides polaires totaux sont potentiellement très insaturés.Le rapport AGS/AGIS des lipides du groupe I est de l'ordre de 0,38-0,40,celui du groupe 2 est évalué à 0,22-0,26.Le rapport moyen des lipides polaires totaux de Fucus serratus est de 0,34-0,36.Les acides gras y sont donc potentiellement plus insaturés que ceux des deux autres algues.

2° Teneurs en différents lipides polaires.

Si qualitativement les lipides polaires de Fucus serratus sont diversement représentés,quantitativement ils ne constituent que 24-26% des lipides polaires totaux (ap).Les lipides du groupe I représentent 9-II% des LP_T (ap),(tableaux VIIa et VIIb) et parmi eux,les X_2,X_3,X_5 occupent 7-8% de LP_T(ap);les X_4,I-I,5%;les X_I ont une teneur variable comprise entre I-2% selon les échantillons considérés et de l'activité métabolique des thalles.Le groupe 2 atteint 20-23% des lipides polaires totaux;les X_9,X_8 sont les deux constituants majoritaires de ce groupe leur teneur peut atteindre I6-I9% des LP_T(ap).Les X_{I0} sont présents de l'ordre de I-2% selon les échantillons et dépendent des activités métaboliques de la plante.Le groupe 3 est représenté par I6-I8% des LP_T dans lequel les X_{I2},X_{I3} sont majoritaires.Les X_{I3} plus abondants peuvent occuper à eux seuls 8-I0% des LP_T.Les X_{I2} en quantité plus modeste sont représentés par I-2% des LP_T (ap),les X_{I4}: 2-3%,les X_{II},$X_{II'}$

2-3%;les X_{I5} dont la teneur varie d'un lot à l'autre,occupent I-2% en moyenne mais lorsque les activités métaboliques sont intenses,la teneur en X_{I5} peut atteindre 8% des LP_T (ap).

En résumé l'équipement en lipides polaires de Fucus serratus présente les caractéristiques suivantes:

- Insaturation potentielle très marquée des acides gras constitutifs des lipides polaires,le rapport AGS/AGIS moyen des lipides polaires totaux est de l'ordre de 0,34-0,36.
- Prédominance des polyesters sulfates et phosphates glycosyl-diglycérides.Les monoesters sulfates et phosphates sont en minorité par rapport aux polyesters sulfates et phosphates.
- Abondance relative des phospholipides totaux par rapport aux sulfolipides totaux.Cette prédominance des phospholipides totaux semble liée aux conditions écologiques de l'habitat de Fucus serratus.

VI.Conclusions.

L'ensemble des résultats analytiques des lipides polaires des trois Fucacées choisies conduit aux conclusions suivantes:

I° Les trois algues sont quantitativement assez riches en lipides polaires totaux,ceux de Pelvetia canaliculata et de Fucus vesiculosus ont une teneur plus élevéque ceux de Fucus serratus.

2° Du point de vue qualitatif les lipides polaires de Fucus serratus sont diversement représentés et le nombre de constituants est plus élevé que chez Pelvetia canaliculata et Fucus vesiculosus

3° P.canaliculata et F.vesiculosus sont relativement plus riches en sulfolipides totaux qu'en phospholipides totaux,l'inverse s'observe chez F.serratus.La prédominance quantitative des phospholipides totaux par rapport aux sulfolipides totaux de F.serratus semble liée aux conditions écologiques propres à cette espèce. Il en est de même de la richesse relative des sulfolipides totaux par rapport aux sulfolipides totaux pour les deux autres algues .

4° Chaque espèce possède un équipement en lipides polaires propre à l'espèce et chaque type d'équipement a des caractéristiques bien définies.Pour chaque équipement,les lipides polaires totaux peuvent être rangés en deux séries nettement distinctes.La première est composée des X_I,X_{I5},X_{IO} et quelle que soit l'espèce considérée.Ces lipides très faciles à extraire,sont présents en faibles quantités et leur teneur varie dans une même espèce selon: les lots,la date de leur récolte et indépendemment de l'espèce. De même les teneurs de X_I en particulier peuvent varier sensiblement selon les méthodes d'extraction employées suivant les condi-

tions de travail. Ces considérations montrent que les X_I, X_{10}, X_{15} ne sont pas des substances engagées dans une structure définie comme les autres lipides polaires, et à ce titre ils peuvent être considérés comme étant des lipides polaires "libres". Ce sont vraisemblablement des intermédiaires métaboliques provenant des autres lipides polaires que nous avons groupés dans la série 2. Celles-ci est composée de lipides polaires majoritaires et minoritaires de chacun des trois groupes. Tous ces lipides sont engagés dans une structure définie, ils sont spécifiquement répartis chez les trois espèces (tableau VIIb). Les teneurs et compositions de ces lipides sont caractéristiques de l'espèce, mais elles peuvent varier occasionnellement si certains facteurs écologiques sont modifiés.

5° F. serratus sont riches en polyesters sulfates et phosphates lipides Les monoesters sulfates et phosphates lipides sont présents mais en plus faible quantité. Dans les deux autres algues, les monoesters sulfates et phosphates lipidiques sont prépondérants.

6° Les acides gras constitutifs des lipides polaires de F. serratus sont potentiellement plus insaturés que ceux des deux autres algues.

7° Il existe chez les trois algues un rapport d'équilibre entre les proportions des lipides polaires des groupes 2 et 3 et ce rapport est caractéristique de l'espèce. Chez Pelvetia canaliculata ce rapport est de l'ordre de 0,47-0,48. Chez F. vesiculosus et F. serratus les rapports sont évalués à 0,68-0,69 et I,25-I,27 respectivement.

Notons que la plupart des lipides polaires des trois Fucacées ont des structures complexes; leur polarité est souvent élevée et ils sont en outre très ioniques. Leur extraction et leur analyse posent des problèmes techniques innombrables, [illegible] pour les obtenir intacts et dans leur quasi totalité. Si les extractions sont trop douces, un grand nombre de ces lipides ne sont pas extraits, par contre une extraction par des procédés trop violents risque de les dénaturer en grande partie, car ils sont tous plus ou moins fragiles. A l'état pur ces lipides polaires sont de surcroît thermolabiles et photodégradables. Par ailleurs chez les trois algues considérées il existe une paroi mucilagineuse très épaisse. Les mucilages de nature polysaccharidique, sulfaté. et phosphaté., sont associés fréquemment à des protéines basiques par des liaisons hydrogène ou de covalence très solides. Ces mucilages jouent un rôle protecteur contre la dessication des algues lors de l'émersion [illegible] prolongée des thalles. La forte polarité de ces mucilages rend l'extraction, de certains sulfolipides et phospholipides très ioniques, presque impossible par les méthodes classiques. Il faut encore y ajouter la présence des "faux complexes" lipoglycoprotidiques dans les diverses membranes; ceux-ci main-

tiennent fortement les lipides polaires dans les structures membranaires,et la dénaturation des lipides polaires lors de leur extraction sont fréquentes.L'extraction par des solvants acides esteefficace,mais les protéolipides et les glycoprotéolipides sont aussi extraits en grande quantité,ce qui rend difficiles les interprétations des résultats obtenus,car en plus des esters sulfates et phosphates extraits,les sérines et éthanolamines protidiques sont aussi extraites en grande quantité.Ces substances dont la polarité est proche de celles des phosphatidyls sérines et phosphatidyls éthanolamines et qui migrent avec ces phospholipides dans la même fraction s'ilsn'ontpas été préalablement éliminés,faussant ainsi tous les résultats d'analyse qualitative et quantitative des lipides polaires séparés.Afin d'éviter des aberrations graves dans les interprétations des résultats,il est nécessaire:d'avoir des techniques adéquates parfaitement adaptées,d'assurer une purification poussée sans destruction des lipides polaires avant la détermination de leur structure.

L'ensemble des lipides polaires des 3 Fucacées choisies joue très vraisemblablement un rôle de premier plan dans la connexion métabolique,établie avec les divers systèmes photosynthétiques appropriés,compatibles avec les conditions écologiques de l'habitat,dont les lumières constituent un facteur de première importance.

La détermination de la répartition intracellulaire des différents lipides polaires chez les 3 algues,permettra de mieux comprendre le rôle des différents lipides polaires dans les diverses fonctions biologiques des algues.On sait que le caractère amphiphile des lipides polaires confère à ces derniers un rôle par excellence,dans le transport actif intermoléculaire des électrons et aussi dans la dispense énergétique d'enzymes mitochondriaux ou cytoplasmiques.Il nous importe de savoir à présent quelles sont les teneurs et composition en lipides polaires des divers organites cellulaires à fonctions hautement spécialisées tels que les chloroplastes et mitochondries et de déterminer:les variations de ces teneurs et compositions en fonction des divers facteurs écologiques et leur interférence dans l'organisation infrastructurale des organites cellulaires.La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'étude de la répartition intracellulaire des 3 groupes de lipides polaires.Nous considérons donc successivement:les chloroplastes,les mitochondries;la fraction restante des cellules sera étudiée globalement sous la rubrique commune de formations cytoplasmiques non chloroplastiques ni mitochondriales (FCNCNM).

DEUXIEME PARTIE

Distribution intracellulaire des lipides polaires de Pelvetia canaliculata (L) Decn et Thur, Fucus vesiculosus (L) et Fucus serratus (L)

I) Techniques de fractionnement cellulaire. p.76

2) Composition et teneur en lipides polaires des fractions C_I,C_2,C_3 chez les trois algues .P.78

I° Fractions C_I de P.canaliculata,Fucus vesiculosus,Fucus serratus.

2° Fractions C_2 de P.canaliculata,F.vesiculosus,F. serratus

3° Fractions C_3 de P.canaliculata,F.vesiculosus,F. serratus

3) Discussions. P.83

4) Conclusions. P.83

I. Distribution intracellulaire des lipides polaires de Pelvetia canaliculata (L) Decn et Thur.

P.canaliculata,F.vesiculosus,et F.serratus possédent tous les 3 une paroi épaisse,riche. en mucoplysaccharides polysulfatés et phosphatés,où le magnésium et le calcium se trouvent complexés en grande quantité.Les cellules algales logées dans ces enveloppes rigides sont donc difficilement libérables.La digestion sélective de leur paroi par les méthodes hydrolytiques douces ou par voie enzymatique est possible,malheureusement,les dénaturations des lipides polaires sont alors souvent importantes;ces techniques sont donc difficilement utilisables.Nous avons donc été amenés à employer diverses méthodes physicochimiques combinées très longues et très délicates à manier mais les résultats obtenus furent satisfaisants bien qu'imparfaits cependant à certains égards.

I. Techniques de fractionnement cellulaire.

Les algues récoltées,lavées,stérilisées sont alors lyophylisées durant 24h.Les thalles déshydratés en grande partie sont placés à -4°C pendant 5-6h,et encore soumis à lyophylisation jusqu'à déshydratation totale.Les mucopolysaccharides lyophylisés sont alors friables,le broyage des thalles se fait sans difficulté dans un broyeur "Moulinex".Cinq grammes environ de poudre séche sont prélevés et mis en suspension fine dans 200ml d'une solution de tampon phosphate à 0,05 Moles/litre,pH 7,4 contenant 0,0I Mole de chlorure de potassium et 0,5 Moles de saccharose L'excès de solution permet de prévenir le gonflement de la poudre déshydratée,très avide d'eau.L'homogénat est ensuite broyé une seconde fois dans un"ultra turrax" pendant 30" puis abandonné à l'agitation magnétique régulière pendant I0'.Enfin filtré sur plusieurs couches d'étamine propre,le filtrat est ensuite centrifugé rapidement à 200g pendant I'.

Le culot I ainsi obtenu contient des débris cellulaires,le surnageant I contient une grande quantité de chloroplastes dont beaucoup sont entiers et les mitochondries.Un millilitre de ce surnageant prélevé est remis en suspension dans un tube conique à centrifugation avec 2ml d'une solution tampon phosphate pH 7,4,contenant du chlorure de potassium et 0,60 Mole de saccharose.Pour provoquer une centrifugation différentielle sur gradient de saccharose,très nette,il faut éviter au départ de mélanger l'homogénat et la solution 2 (l'homogénat est en suspensiondans la solution I,celle-ci est moins concentrée en saccharose que la solution 2) Il est donc nécessaire d'obtenir au départ deux phases nettement séparées Le 2è tube est mis à centrifuger à I000g pendant I0'.Le culot 2 obtenu contient des chloroplastes en grande quantité dans la zone inférieure du tube,la zone supérieure contient des organites de plus petite dimensions et qui se révèlent au microscope électronique comme étant des mitochondries.Après élimination du surnageant les culots 2 sont remis en suspension fine dans 30ml de tampon phosphate 0,05 Mole contenant 0,I5 Mole de KCl.Une aliquote de cette suspension est prélevée pour l'observation au microscope électronique à titre de contrôle.Le restant est remis à centrifuger dans l'ordre de vitesse suivante:

I) I000g,I0',donnant le culot 3
2) 5000g,I0' " " " 4
3) I0000g,30' " " " 5
4) 40000g,30' " " " 6
5) I60000g,60' " " " 7

Les différents culots obtenus sont mis aussitôt en suspension dans I0ml d'une solution de tampon phosphate 0,05 Mole/KCl,une aliquote de chaque suspension est prélevée afin de suivre au microscope électronique l'évolution de la purification des organites isolés.L'aliquote prélevée est filtrée d'abord sur millipore et sous pression,le résidu récolté soigneusementest alors fixé au glutaldéhyde.Après plusieurs lavages successifs par le tampon phosphate 0,025 Mole,les résidus sont fixés ensuite au tétroxyde d'osmium (OsO_4) à 2% dans le tampon phosphate pendant Ih.Le séchage préalable durant quelques heures par l'éthanol en présence d'oxyde de propylène à température ambiante,doit être mené soigneusement avant l'imprégnation à"l'EPON".Ces résidus sont ensuite colorés par l'acétate d'uranyle en solution éthanolique pendant 2h,puis coupés à l'ultramicrotome.Les coupes sont laissées dans le tampon citrate pendant 20' selon le procédé de FISKE S. (I00) avant leur observation au microscope électronique(Les travaux de microscopie électronique et de microphoto ont été exécutés au laboratoire de M.E. de l'Institut Pasteur.)

Les observations au M.E. permettent de regrouper les culots et amènent

aux conclusions suivantes:

- Le culot I contient des débris cytoplasmiques des cellules algales moins les chloroplastes et mitochondries,nous le désignons par C_I
- Les culots 2,3,4 contiennent des chloroplastes enrichis,plus une faible quantité de mitochondries et quelques fragments de parois cellulaires.Nous les désignerons par C_2.
- Les culots 5,6,7 contiennent des mitochondries en grande majorité plus quelques débris cytoplasmiques de très petites tailles,nous les désignons par C_3.

2. Etude des compositions et teneurs en lipides polaires des fractions C_I,C_2,C_3 chez les trois algues [illegible].

I° Fractions C_I.

La fraction C_I contient 35-40% de débris cellulaires,50-60% de fragments de parois mucopolysaccharidiques et un faible pourcentage de chloroplastes et de mitochondries.Afin d'éliminer dans la première étape les fragments des parois,la fraction C_I est d'abord soumise à une hydrolysè douce en présence de ClH à pH 5 pendant I5' à froid puis 5' à 60°C avec agitation régulière.Après centrifugation à 500t/mn pendant I',le culot est remis à hydrolyser en présence de HCl N dilué au I/50ème,pH 6,5 environ et pendant Ih à froid.Après neutralisation par CO_3Na_2 puis NaOH N de l'hydrolysat,on l'abandonne pendant 24h à 0° C,puis on le centrifuge à 5000t/mn pendant 5'.Le surnageant contient les produits hydrolysés provenant des parois riches en sucres sulfatés et phosphatés,et en sulfates et phosphates minéraux libres,mais aucune trace de lipides polaires n'a été révélée.Les éthanolamines et sérines non lipidiques s'y sont trouvéesaussi en quantité non négligeable.Le culot contient le reste des cellules de l'algue enveloppées d'un squelette friable,faciles à éliminer. L'extraction des lipides polaires de ce culot se fait ensuite selon la méthode préconisée.Les résultats obtenus (tableau VIII) montrent la distribution suivante des lipides polaires des fractions C_I.

A. Pour Pelvetia canaliculata.

La fraction C_I contient tous les lipides de la série I dont les teneurs varient d'un échantillon à l'autre,selon les activités métaboliques des thalles.Les X_I sont quantitativement les moins importants,ils représentent I0-II% des lipides polaires totaux de la fraction C_I.X_{I0}, X_{I5} sont les plus abondants et occupent 9-II% pour les premiers et I0-I2% pour les seconds.Leurs variations quantitatives,en relation avec les activités métaboliques des thalles,sont de faible amplitude,sauf pour quelques cas particuliers.La deuxième série est représentée par X_4,X_5 du groupe I et qui sont les plus abondants.Les X_3,X_2 du même groupe, présents en faible quantité relativement dans les fractions C_I de P. canaliculata,occupent 4-5% des LP_T présents.Les X_6,X_7 du groupe 2 pré-

sents aussi dans les fractions C_I de P.canaliculata mais en plus faible quantité que les lipides du groupe I.Les X_{II},X_{II}, ont des teneurs ne dépassant en aucun cas 2% des LP_T de C_I.Pour ces deux lipides,leur appartenance à des organites isolés dans C_I est incertaine.Les autres lipides de la série 2 et quelle que soit leur teneur, trouvée dans C_I, proviennent vraisemblablement des mitochondries et des chloroplastes contaminant les fractions C_I.La teneur est variable dépendant des quantités des chloroplastes et mitochondries des fractions C_I.

B. Pour les Fucus vesiculosus.

Ici la fraction C_I contient aussi tous les lipides polaires de la première série,leur teneur globale est de l'ordre de 31% des lipides polaires de cette fraction.Les X_4,X_5 sont les plus abondants,les X_2,X_3 sont présents mais en plus faible quantité,de même les X_6,X_7,X_8 du groupe 2.Les autres lipides des groupes 2 et 3,à l'exception des X_{10} et X_{15} ne font pas partie des formations cytoplasmiques de la fraction C_I: leur teneur diminue avec la purification progressive de la fraction C_I isolée.

C. Pour les Fucus serratus.

Dans les fractions C_I de F.serratus les lipides polaires de la série I sont aussi présents et constituent 30-40% des lipides polaires totaux de la fraction.Les X_4,X_5 sont présents en forte quantité,constituant environ 50% des lipides polaires de C_I dans la plupart des cas.Les X_2,X_3 sont aussi présents et malgré leur teneur relativement faible,ils font partie intégrante des formations cytoplasmiques non chloroplastiques et non mitochondriales,de F.serratus.Il en est de même des X_6,X_7,X_8 du groupe 2.Les autres lipides polaires des groupes 2 et 3 des fractions C_I de F.serratus ne font pas partie des formations cytoplasmiques non chloroplastiques ni mitochondriales tout comme chez les 2 premieresespèces.

Discussion.

Les formations cytoplasmiques, autres que les mitochondries et les chloroplastes, isolées dans les fractions C_I des 3 algues sont constituées principalement des lipides polaires de la première série dont les X_I,X_{10} X_{15}.Ceux-ci sont exclusivement des lipides polaires des formations cytoplasmiques non chloroplastiques et non mitochondriales,quelle que soit l'espèce considérée.Les X_4,X_5 sont aussi des constituants lipidiques de ces mêmes formations,ils y sont en grande quantité en général pour les 3 algues étudiées.Les X_2,X_3 sont présents aussi mais en plus faible quantité.Il en est de même des X_6,X_7,X_8.Les autres lipides polaires quelle que soit leur teneur dans C_I proviennent des autres organites cellulaires qui contaminent plus ou moins les fractions C_I isolées et dont la teneur dépend de la pureté des C_I isolés.

2° Fractions C_2.

Les fractions C_2 contiennent dans la plupart des cas 70-75% de.

TABLEAU VIII

Répartition des lipides polaires dans les fractions C_I, C_2, C_3 isolées.

	Fractions	Poids par 100 grammes des fractions C_I, C_2, C_3 dépigmentées								
		P.can	F.ves.	F.ser	P.can	F.ves	F.ser	P.can	F.ves	F.ser
Lipides		C_I			C_2			C_3		
Série I	X_I	11%	10%	12%	—	—	—	—	—	—
	X_{10}	10%	8%	10%	—	—	—	1,5%	1,4%	—
	X_{15}	12%	13%	14%	—	—	—	—	—	2%
Série 2	X_2	5%	5%	4%	4%	3%	2%	6%	6%	18%
	X_3	4%	4%	4%	3%	2%	6%	18%	22%	16%
	X_4	24%	26%	30%	3%	4%	2%	30%	16%	10%
	X_5	22%	24%	22%	2%	3%	2%	24%	35%	30%
	X_6	5%	3%	1%	10%	12%	2%	12%	8%	8%
	X_7	3%	3%	1%	6%	10%	4%	—	4%	3,5%
	X_8	1,5%	2%	0,5%	8%	10%	5%	4%	5%	4%
	X_9	—	—	—	4%	—	28%	—	—	—
	X_{11}	—	—	—	2%	10%	3%	1%	—	1,5%
	$X_{11'}$	—	1%	—	15%	17%	3%	—	—	traces
	X_{12}	—	1%	1%	34%	22%	10%	—	—	—
	X_{13}	—	—	—	6%	5%	22%	—	—	traces
	X_{14}	—	—	—	3%	1%	8%	3%	—	4%

Nota. C_I = formations cytoplasmiques non chloroplastiques ni mitochondriales

C_2 = chloroplastes

C_3 = mitochondries

chloroplastes,20-22% de mitochondries et I-2% de débris cytoplasmiques. Les purifications plus poussées de ces fractions sont difficiles à obtenir,les enrichissements en chloroplastes sont faibles et ce,malgré les méthodes les plus fines de dentrifugation différentielle employée successivement.Les résultats analytiques des lipides polaires sont faciles à interpréter malgré la contamination relativement importante en mitochondries,les teneurs en lipides polaires de ces organites étant faibles et leur composition qualitative reste assez limitée et nettement définie . L'absence des débris cytoplasmiques dans C_2,limite par ailleurs les erreurs d'interprétations des résultats dues aux contaminations.La répartition des lipides polaires dans les fractions C_2 est la suivante chez les 3 algues: (tableau VIII)

A. Pelvetia canaliculata.

Cette fraction C_2 est quantitativement riche en X_{I2},X_{II},$X_{II'}$ .Ces 3 lipides représentent plus de 50% des lipides polaires de la fraction C_2 Les X_{I3},X_{I4} sont présents aussi mais en quantité plus faible.Les lipides du groupe 2 sont représentés par les X_6,X_7,X_8 et constituent 22-24% des lipides polaires de C_2.Les X_9 sont présents aussi mais en plus faibles quantités,leur teneur en effet ne dépasse pas 2% des lipides de C_2 dans le meilleur des cas.Les lipides du groupe I sont représentés par les X_2 X_3,X_4,X_5 en quantités faibles mais non négligeables.Les lipides de la première série ne font pas partie des lipides chloroplastiques quoique présents dans les fractions C_2,souvent à l'état de trace,provenant des débris cytoplasmiques qui contaminent les C_2.

B. Fucus vesiculosus.

Chez F.vesiculosus les chloroplastes sont de dimensions moyennes relativement petites comparativement à ceux de P.canaliculata et F.serratus mais ils sont quantitativement plus abondants,constituant 0,30-0,40% du poids sec des thalles.Les fractions C_2 de F.vesiculosus sont relativement pauvres en chloroplastes;malgré les enrichissements successifs,on ne peut obtenir plus de 60% de chloroplastes dans les fractions les plus pures.On y trouve environ I5-20% de mitochondries et autant de débris cytoplasmiques de très petites tailles.Les résultats analytiques des lipides polaires sont malgré tout interprétables,bien que les appréciations soient moins bonnes que pour les C_2 des deux autres algues.Les répartitions des lipides polaires dans les chloroplastes de F.vesiculosus sont les suivantes: (tableau VIII).

• Les X_{I2},X_{II},$X_{II'}$ les plus abondants totalisent plus de 50% des lipides polaires de C_2 .Les X_6,X_7,X_8 viennent au second rang avec 32% environ,les X_{I3},X_{I4} présents aussi mais leur teneur est relativemert faible.

• Les X_2,X_3 ,X_4,X_5 sont présents en quantité faible comparée aux li-

pides des deux autres groupes.Les lipides de la première série sont absents des chloroplastes de F.vesiculosus bien qu'ils furent identifiés dans les fractions C_2 en faible quantité.Les X_9 absents chez les F.vesiculosus dans la majorité des lots récoltés,sinon en très faible quantité.

C. Fucus serratus.

La fraction C_2 de F.serratus contient environ: 70% de chloroplastes IO-I2% de débris cellulaires et 4-8% de mitochondries.Les chloroplastes de F.serratus sont en général très volumineux et en moyenne plus grand que ceux de P.canaliculata.Leur séparation du reste de la cellule est de ce fait facilitée,et les résultats pourront donc être interprétés avec plus de précision.Les lipides polaires des chloroplastes de F.serratus sont : (tableau VIII)

.Les X_{I2},X_{I3} du groupe 3 sont les plus abondants et représentent à eux deux 35-38% des lipides polaires de C_2,les X_{II},$X_{II'}$,X_{I4} font aussi partie des lipides chloroplastiques de F.serratus mais leur teneur reste faible comparativement à celle des X_{I2}, et des X_{I3}.

. Les lipides du groupe 2 sont dans l'ensemble les mieux représentés des 3 groupes quantitativement.Parmi ceux-ci les X_9,X_8 constituent 33-34 les X_6,X_7 sont aussi présents mais en plus faible quantité.

.Enfin les X_2,X_3,X_4,X_5 font aussi partie des lipides chloroplastiques mais leur teneur globale ne dépasse pas I2% des lipides de C_2 de F.serratus .Les lipides polaires de la série I n'existent pas dans les chloroplastes de F.serratus.

Discussions.

Les fractions C_2 isolées à partir des trois algues contiennent toutes les lipides de la deuxième série,les lipides de la première série par contre ne sont pas représentés;ils ne font pas partie des lipides chloroplastiques vraisemblablement.Les chloroplastes des 3 algues sont constitués par:

.X_2,X_3,X_4,X_5 du groupe I,leur teneur globale est faible comparativement aux autres lipides et ceci quelle que soit l'algue considérée.

.Les X_7,X_8,X_9du groupe 2 et enfin les X_{II},$X_{II'}$,X_{I2},X_{I3} et les X_{I4} du groupe 3 sont tous présents dans les chloroplastes des 3 algues,seules leurs teneurs diffèrent.

Les chloroplastes de P.canaliculata et de F.vesiculosus sont plus riches en lipides du groupe 3 et moins riches en lipides polaires du groupe 2 l'inverse s'observe dans les chloroplastes de F.serratus.

Concernant les rapports des proportions molairesdes lipides,celui du Gr2/Gr3 pour les lipides chloroplastiques de F.serratus est de l'ordre de I,IO.Pour les P.canaliculata et F.vesiculosus ils sont évalués respectivement à 0,68 et 0,85.Enfin signalons aussi que les chloroplastes

de F.serratus sont riches en polyesters sulfates et phosphates lipidiques,ceux des deux autres algues sont au contraire mieux pourvus en monoesters sulfates et phosphates.Rappelons que P.canaliculata et F.vesiculosus ont des habitats proches et plus aériens.Les éclairages qu'ils reçoivent quotidiennement sont qualitativement et quantitativement très proches,il semble par conséquent normal que leurs chloroplastes affichent des compositions et teneurs en lipides polaires identiques.F.serratus au contraire a son habitat,aquatique,plus bas sur le littoral.Les lumières reçues sont quantitativement et qualitativement différentes de celles dispensées aux P.canaliculata et F.vesiculosus.Les différences des teneur et composition en lipides polaires de leurs chloroplastes pourraient y trouver une explication valable.

3° Fractions C_3.

Les fractions C_3 contiennent en général 60-65% environ de mitochondries,constituant 0,05% du poids sec des thalles.La quantité relativement faible de ces organites pose des difficultés considérables pour le dosage des lipides polaires constitutifs,les précisions des résultats sont souvent médiocres.Les valeurs fournies par nos analyses des fractions de C_3 représentent des teneurs moyennes à 15% d'erreurs près.La répartition des lipides polaires dans les fractions C_3 des 3 algues considérées sont les suivantes:

A. Pelvetia canaliculata.

Chez cette espèce les X_4,X_5,X_3,X_2,sont les mieux représentés et totalisent plus de 74% des lipides de C_3.Les lipides du groupe 2 sont représentés par les X_6,X_8,les X_7,X_9 ne sont pas toujours présents dans les fractions de C_3 de P.canaliculata.De même les lipides du groupe 3 et ceux de la première série;aucun de ces lipides ne font pas partie des mitochondries de cette algue..

B. Fucus vesiculosus.

Les fractions C_3 de F.vesiculosus sont assez faciles à purifier. Les mitochondries chez cette algue sont relativement abondantes et les C_3 peuvent alors contenir jusqu'à 80% de ces organites après plusieurs purifications successives.Parmi les lipides polaires de C_3 les X_5,X_3,X_4 et X_2 sont les plus abondants et représentent 69-75% des lipides polaires de cette fraction.Les X_6,X_7,X_8 du groupe 2,sont aussi présents et font partie des mitochondries de cette algue.Les lipides du groupe 3 ainsi que les lipides de la série I,absents,ne sont pas les lipides des mitochondries de F.vesiculosus.La présence de ces lipides dans les fractions C_3 provient vraisemblablement des restes de chloroplastes contaminants des fractions C_3 en plus ou moins grande quantité.Il en est de même pour X_{10} de la série I représentant 1,5% des lipides polaires de C_3 de Fucus vesiculosus.

C. Fucus serratus.

Dans les fractions C_3 de F.serratus,les X_5,X_2,X_3,X_4 constituent aussi les lipides majoritaires;ils représentent plus de 73% des lipides polaire de la fraction.Le groupe 2 est aussi bien représenté,les X_6,X_7,X_8 sont aussi présents tandis que les X_9 ne font pas partie des lipides mitochondriaux de F. serratus.Les lipides du groupe 3 n'existent pas dans les mitochondries de cette algue de même les lipides de la série I bien que les X_{II} et les X_{I4} fussent repérés dans les fractions C_3 de F.serratus;ils proviennent vraisemblablement des chloroplastes contaminant ces fractions. Les X_{13} évalués à 2% des lipides de C_3 proviennent des débris cytoplasmiques qui contaminent la fraction,leur teneur peut être notablement réduite par purification progressive des C_3.

Discussions.

Les mitochondries des 3 algues contiennent toutes,les lipides des groupes I et 2.Ceux du groupe I sont les plus abondants et occupent plus de 70% des lipides de C_3 et ceci quelle que soit l'espèce considérée.Chez P.canaliculata les X_4,X_5 sont majoritaires X_7,X_9 sont absents.Chez F.vesiculosus et F.serratus les X_3 et X_5 sont majoritaires,les X_2 et X_4 occupent la deuxième place.Les lipides du groupe 2 sont représentés par X_6,X_7 et X_8 chez F.vesiculosus et F.serratus alors que chez P.canaliculata seul les X_6 et les X_8 sont présents.Les lipides de la première série ne sont pas représentés dans les mitochondries d'aucune des 3 algues.De même aucun des lipides du groupe 3 ne fait partie des mitochondries des 3 espèces.

Conclusions.

L'étude de la répartition des lipides polaires des 3 algues choisies (tableaux VIII et IX),montre que les lipides polaires constitutifs de chacune des 3 espèces,se trouvent répartis de façon caractéristique dans les divers organites cellulaires,et participent à leur organisation infrastructurale,compatible à la fonction physiologique qui leur est dévolue.

a) Les chloroplastes ont en général une teneur et composition très diverses et ce quelle que soit l'espèce.Chez P.canaliculata et F.vesiculosus les teneur et composition en lipides chloroplastiques sont identiques à peu de chose près,ceci sans doute en raison des habitats très voisins de ces 2 espèces.Les lipides de la série 2 sont tous présents dans les chloroplastes des 3 algues,sauf les X_9 qui sont absents chez les F.vesiculosus. En outre chez les P.canaliculata et les F.vesiculosus les monoesters sulfates et phosphates sont majoritaires,les polyesters sulfates et phosphates lipides sont présents mais en plus faible quantité.Ces lipides sont au contraire les plus abondants chez les F.serratus.Les monoesters sulfates et phosphates sont moins bien représentés quantitativement chez les F.serratus.En outre chez les F.serratus les polyesters phosphates sont plus abondants que les polyesters sulfates,de même les monoesters sulfate

TABLEAU IX

Répartition des lipides polaires dans les différents organites cellulaires, des trois Fucacées étudiées.

Organites / Lipides polaires			Pelv. canaliculata			Fucus vesiculosus			Fucus serratus		
			A.F.C.	Chlorop	Mitoc.	A.F.C	Chlorop.	Mitoc	A.F.C	Chlorop.	Mitoc
Série I	X_I	GrI	+++	—	—	++	—	—	+++	—	—
	X_{I0}	Gr2	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	X_{I5}	Gr3	+++	—	—	+++	—	—	+++	—	—
Série 2	X_2	GrI	+	+	++	+	+	++	+	+	+++
	X_3		+	+	+++	+	+	+++	+	++	+++
	X_4		+++	+	++++	++++	+	+++	++++	+	++
	X_5		+++	+	+++	+++	+	++++	+++	+	++++
	X_6	Gr2	+	++	+++	+	+++	++	+	+	++
	X_7		+	++	—	-	++	+	+	+	+
	X_8		+	++	+	+	++	+	trace	+	+
	X_9		—	+	—	—	—	—	—	++++	—
	X_{II}	Gr3	—	+	+	—	++	—	—	+	+
	$X_{II'}$		—	+++	—	+	+++	—	—	+	—
	X_{I2}		—	++++	—	+	+++	—	-	++	—
	X_{I3}		—	++	—	—	+	—	—	+++	—
	X_{I4}		—	+	+	—	+	—	—	++	+

Nota. A.F.C = Autres formations cytoplasmiques non chloroplastiques ni mitochondriales.

Chlorop.= Chloroplastes.

Mitoc= Mitochondries.

— = absent

trace=inférieur à I%

+ = I-5% ++ = 6-I0% +++ = II-25% ++++ = 26-40%

(Poids par cent grammes de lipides polaires totaux des fractions C_I, C_2, C_3 séparées.)

sont prépondérants comparativement aux monoesters phosphates chez les P.canaliculata et F.vesiculosus.Concernant les lipides du groupe I,les chloroplastes des 3 algues en contiennent tous,leur teneur est proportionnellement comparable. Enfin aucun lipide de la série I ne sont pas présents dans les chloroplastes des trois algues.

b) Dans les mitochondries,composition et teneur en lipides polaires ont des profils identiques chez les trois espèces.Les lipides de la série I sont tous absents.Les lipides du groupe I sont majoritaires et totalisent 70-80% des lipides des mitochondries quelle que soit l'espèce considérée. Les lipides du groupe 2 sont présents à l'exception des polyesters phosphates.En outre les mitochondries de P.canaliculata ne contiennent pas de X_7 alors que chez les 2 autres algues ce lipide est présent en quantité non négligeable.Enfin les lipides du groupe 3 ne font pas partie des mitochondries d'aucune des 3 espèces considérées.

c) Concernant les autres formations cytoplasmiques non chloroplastiques et non mitochondriales,nous avons noté la présence d'une grande quantité de lipides de la série I.Les lipides de la série 2 ne sont représentés que par des lipides du groupe I qui sont majoritaires dans ces formations quelle que soit l'espèce.Les lipides du groupe 2 sont aussi présents dans ces formations,leur teneur globale ne dépasse pas 8% des lipides polaires de ces formations et ce quelle que soit l'espèce.Les lipides du groupe 3 ne font pas partie de ces formations,chez les 3 espèces indifféremment.

En résumé,les répartitions des lipides polaires au niveau des organites cellulaires chez les 3 algues étudiées sont les suivantes:

- Série I = lipides des FCNCNM exclusivement.
- Série 2 = Groupe I = lipides communs à tous les organites cellulaires minoritaires dans les chloroplastes,majoritaires dans les autres formations.

  Groupe 2 = lipides communs aux organites considérés à l'exception des polyesters phosphates.Les chloroplastes et les mitochondries en contiennent en grande quantité;ailleurs, ces lipides sont présents mais en faible quantité.

  Groupe 3 = lipides exclusivement chloroplastiques;les autres formations ne contiennent aucun des lipides du groupe 3.Les chloroplastes de P.canaliculata et de F.vesiculosus sont plus riches en ces lipides que les F.serratus .

Enfin rappelons que les polyesters sulfates et phosphates sont exclusivement des lipides des chloroplastes chez les 3 algues,les autres formations en sont complètement dépourvus.

TROISIEME PARTIE.

I. Etudes des variations des teneur et composition des lipides polaires au cours des quatre saisons. p.86

1° Lots récoltés entre Juin et Septembre.(témoins) .p.86

2° Lots récoltés entre Septembre et Décembre .p.86

A. Pelvetia canaliculata (chloroplastes,mitochondries...)

B. Fucus vesiculosus (chloroplastes,mitochondries,...)

C. Fucus serratus (chloroplastes,mitochondries,...) p.90

3° Lots récoltés entre Janvier et Mars. p.93

A. Pelvetia canaliculata (chloroplastes,mitochondries, ...

B. Fucus vesiculosus (chloroplastes,mitochondries,...)

C. Fucus serratus (chloroplastes,mitochondries,...)

4° Lots récoltés entre Mars et Juin. p97

A. Pelvetia canaliculata (chloroplastes,mitochondries...)

B. Fucus vesiculosus (chloroplastes,mitochondries,...)

C. Fucus serratus (chloroplastes,mitochondries,...)

Conclusions .p.102

II. Etudes expérimentales de la variation des teneur et composition en lipides polaires en fonction de certains facteurs écologiques. p.108

1° Effets de la lumière artificielle. p.109

2° Effets des éclairages continus. p.110

3° Effets de l'obscurité totale et permanente. p;113

4° Effets des variations des intensités lumineuses. p.117

5° Effets des lumières filtrées sélectives (275-400nm,370-520nm, et 400-650nm) .p.12

6° Effets de l'immersion continue. p.133

7° Effets de l'émersion permanente. p.137

III. Etudes des effets de la carence en soufre et en phosphore,sur les variations des teneur et composition en lipides polaires,et leur répercussion sur la biosynthèse d'autres substances soufrés et phosphorés non lipidiques. p.142

A. Carence en soufre. p.142

-Méthodes d'études. p.143

-Résultats expérimentaux et conclusions. p.161

B. Carence en phosphore.p.155

-Méthodes expérimentales p.156

-Résultats et conclusions. p.159

IV. Applications de la technique de marquage à l'étude des variations des teneur et composition des lipides polaires des 3 algues. p.161

CONCLUSIONS GENERALES. p.169

TROISIEME PARTIE

Les études précédentes ont montré des différences très nettes entre les teneurs et compositions en lipides polaires des 3 Fucacées que nous avons choisies.Ces différences sont d'autant plus significatives qu'elles semblent liées à la biologie de l'espèce.L'étude de la répartition intracellulaire des différents lipides polaires montre en outre que les organites à fonction hautement spécialisée,en l'occurrence les chloroplastes et les mitochondries,possèdent un ensemble de lipides polaires qui leur est propre,caractérisant aussi l'espèce.Ces lipides polaires participent à l'organisation infrastructurale de ces organites,leurs rôles sont sans doute importants biologiquement.

La détermination de la variation des teneur et composition de ces lipides en fonction des divers facteurs écologiques permettra de mettre en évidence la participation de ces substances dans la physiologie des algues ainsi que leur interférence dans la synthèse des diverses substances lipidiques ou non.

Au cours de cette partie du travail,nous avons été amené à étudier les variations des teneur et composition en lipides polaires dans les trois algues choisies et dans les conditions suivantes:

I. Au cours des saisons d'une même année.

II. Cultures expérimentales en lumière blanche artificielle complète et en lumière artificielle sélective, quantitativement et qualitativement.

III. Cultures expérimentales sous alternances rythmées :

A. Lumière/Obscurité

B. Immersion/Emersion.

IV. Cultures expérimentales carencées en soufre et en phosphore.

V. Applications de la technique de marquage et détermination du rapport métabolique lipides/non lipides soufrés et phosphorés chez les trois algues.

I. Etudes des variations des teneurs et compositions au cours des saisons

I) Lots récoltés entre Juin etSeptembre.

Les lipides polaires des thalles jeunes des 3 espèces que nous avons analysés au cours des études précédentes proviennent de lots récoltés entre les mois de Juin et Août,ils nous serviront de témoins dans cette détermination des variations .

Les résultats analytiques obtenus sont consignés dans les tableaux X et XI

2) Lots récoltés entre Septembre et Décembre (lots d'automne).

A. Pelvetia canaliculata.

L'analyse des lipides polaires des lots d'automne montre une dimi-

nution faible et régulière des lipides de la série I entre Septembre et Novembre. Les teneurs en ces lipides sont de 3% inférieurs à celles des témoins et se stabilisent autour de 3,3%. Cette baisse traduit un ralentissement des activités métaboliques des thalles au début de l'automne et qui se prolonge pendant toute la durée de la mauvaise saison.

Les lipides phosphorés totaux ont augmenté de 6-8% par rapport aux témoins entre Septembre et Novembre et leurs taux se stabilisent autour de 9% supérieurs à ceux des témoins et ce à partir de Décembre. Les X_4, X_5 ont diminué de 2% durant cette période. Les X_2, X_3 n'ont pas varié comparativement à leur teneur initiale. Les X_6, X_7, X_8 augmentent de 8-10% de Septembre à Novembre puis leur teneur se maintient constante autour de 12% à partir de Décembre. La teneur de X_9 a augmenté très vite au début de Septembre jusqu'en Octobre, puis entre Octobre et Décembre elle subit une baisse régulière pour se maintenir autour d'une valeur de 2% supérieure à celle des témoins.

Les lipides soufrés totaux ont au contraire diminué de 5-6% au début de l'automne entre Septembre et Novembre puis de 8-9% pour se maintenir à partir de Décembre à une valeur de 9% inférieure à la teneur des témoins. Les X_{II}, $X_{II'}$ ont diminué de 4-6% dès le début de Septembre; ils se maintiennent à ce taux pendant toute la durée de l'automne. Les X_{I2} ont subi une baisse de 2%, les X_{I3} ont au contraire augmenté de 6-8% entre Septembre et Novembre, puis de 7-9% à partir de Décembre. Les X_{I4} ont diminué très rapidement de Septembre à Octobre et à partir de Novembre on n'en trouve plus qu'à l'état de trace. Le rapport LPh_T/LS_T des lots d'automne est évalué à 0,97. Concernant les acides gras constitutifs des lipides polaires de Pelvetia canaliculata, nous avons constaté une tendance générale à une insaturation potentielle. Le rapport AGS/AGIS étant de l'ordre de 0,37 pour les lipides polaires totaux, mais au niveau des groupes, les lipides du groupe I ont gardé le même degré de saturation potentielle que celui des témoins. Les lipides du groupe 2 sont nettement plus insaturés que ceux du groupe 2 des témoins. Les lipides du groupe 3 sont aussi plus insaturés par rapport aux témoins, mais plus faiblement par rapport aux acides gras constitutifs des lipides polaires du groupe 2.

Au niveau des différents organites cellulaires, nous avons constaté les variations suivantes: (tableaux X et XI)

- Chloroplastes.

Les chloroplastes de Pelvetia canaliculata des lots d'automne ont les caractéristiques suivantes:

- Rapport LPh_2Gr2/LS_3Gr3 inférieur à celui des témoins. Ce rapport est évalué à 1,10 contre 0,90 pour les témoins. Les lipides du groupe 2 sont donc quantitativement plus abondants que ceux du groupe 3, dans

TABLEAU X

Variations des composition et teneur des lipides polaires des trois Fucacées choisies au cours des saisons.

Espèces / Lipides polaires			Poids par cent grammes de lipides polaires totaux (ap)											
			Pelv. canaliculata				Fucus vesiculosus				Fucus serratus			
			P	E	A	H	P	E	A	H	P	E	A	H
Série I	Gr1	X_1	I,I0	I,00	0,90	0,70	I,65	I,50	I,05	0,86	2,I0	2,00	0,80	0,50
	Gr2	X_{I0}	2,28	2,I0	I,95	I,50	2,60	2,50	2,35	I,95	2,I5	2,0	I,88	I,20
	Gr3	X_{I5}	2,25	2,00	I,45	I,I0	I,55	I,50	I,40	0,90	I,75	I,50	I,25	0,7
Série 2	Gr1	X_2	I,I0	I,00	I,20	I,45	I,IC	I,00	2,00	2,45	2,65	2,50	2,50	2,55
		X_3	I,65	I,50	I,65	I,80	2,I0	2,00	2,50	2,90	2,I2	2,00	2,I0	2,17
		X_4	2,I2	2,00	I,80	I,85	I,60	I,50	I,40	I,38	I,65	I,50	I,55	I,56
		X_5	2,85	2,70	2,50	2,40	3,30	3,00	2,80	2,75	3,55	3,50	3,60	3,65
		X_6	2,25	2,00	3,20	3,I0	3,60	3,30	3,20	3,05	I,I0	I,00	I,I0	I,I2
		X_7	3,20	3,00	3,80	3,50	6,I0	5,50	5,50	5,35	2,05	I,50	I,45	I,30
	Gr2	X_8	5,20	5,00	5,60	5,45	8,I0	6,50	7,30	7,65	2,55	2,50	2,40	2,38
		X_9	2,60	2,50	3,30	3,90	0,I0	0,00	0,25	0,28	I4,55	I6,00	I6,30	I8,80
		X_{I1}	3,00	2,50	2,60	2,60	2,52	2,50	2,40	I,65	I,65	I,50	I,40	I,00
		X_{I1}	3,50	3,00	3,20	3,I5	5,I0	5,00	3,60	5,I0	I,05	I,00	0,90	0,60
	Gr3	X_{I2}	22,00	20,00	I8,00	I7,65	I4,I0	I4,00	I3,90	I4,00	2,I0	2,00	I,90	I,40
		X_{I3}	3,90	3,00	3,20	4,45	I,25	I,00	I,I2	I,I6	9,55	I0,C0	I0,50	I0,90
		X_{I4}	2,80	2,00	I,I0	3,25	I,09	I,00	I,I0	I,28	2,45	2,50	I,20	I,00
LP_T/I00gr de Lip. tot. (ap)			23	20	2I	22	26	23	23,50	23,50	26	26	27	27,50
AGS/AGIS des LP_T			0,38	0,42	0,37	0,36	0,39	0,40	0,38	0,36	0,32	0,34	0,30	0,26
Poids par cent grammes de lipides polaires totaux avec pigments polaires (ap)														
PL_T (ap).			22	25	26	26	27	26	27	28	34	34	35	36
SL_T (ap).			39	35	33	32	27	25	23	2I	I8,2	I8	I7	I5
$LP_T Gr2/LP_T Gr3$			0,44	0,45	0,60	0,52	0,80	0,92	0,79	0,76	0,90	I,27	I,35	I,58

Nota. AGS/AGIS = Rapport de proportion des acides gras saturés /inisaturés.

LP_T = lipides polaires totaux PL_T = Phospholipides totaux

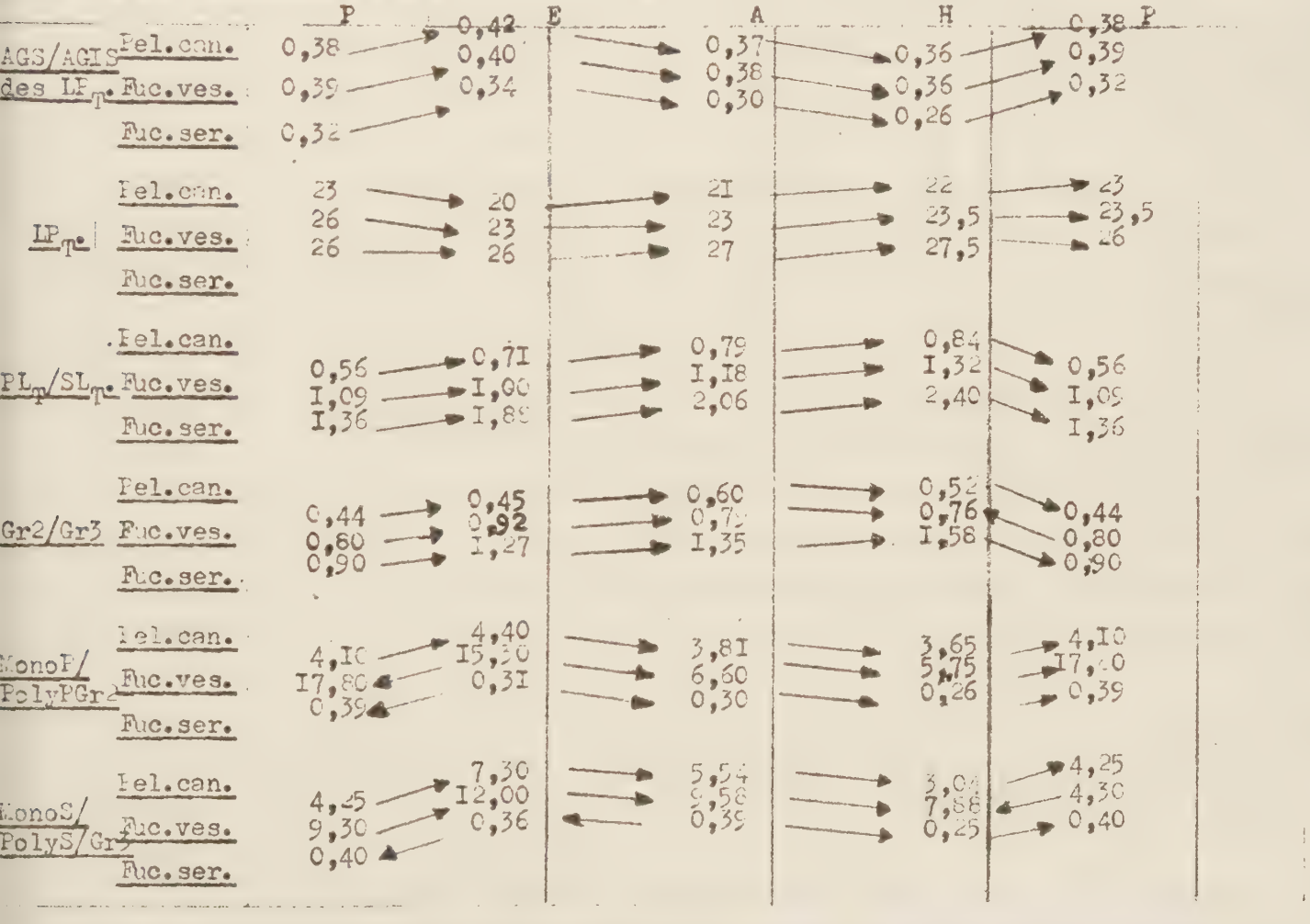
SL_T = Sulfolipides totaux $LP_T Gr2/LP_T Gr3$ = lipides polaires totaux du groupe 2/lipides polaires totaux du Groupe 3

E-P-A-H = été-printemps- automne-hiver.

TABLEAU XI

Composition et teneur en lipides polaires des divers organites cellulaires des 3 Fucacées.

Lipides	Espèces	Série I					Série 2			
		GrI	Gr2	Gr3	GrI		Gr2		Gr3	
					Maj.	Min.	Maj.	Min.	Maj.	Min.
Autres format. cytopl.	Pel.can.	X_I	X_{I0}	X_{I5}	X_4, X_5	X_2, X_3	—	—	—	—
	Fuc.ves.	X_I	X_{I0}	X_{I5}	X_4, X_5	X_2, X_3	—	—	—	—
	Fuc.ser.	X_I	X_{I0}	X_{I5}	X_4, X_5	X_2, X_3	—	—	—	—
Chloro-plastes	Pel.can.	—	—	—	X_2, X_3	X_4, X_5	X_6, X_7, X_8	X_9	X_{I2}, X_{II}, X_{II}	X_{I3}, X_{I4}
	Fuc.ves.	—	—	—	X_2, X_3	X_4, X_5	X_6, X_7, X_8	—	X_{I2}, X_{II}, X_{II}	X_{I3}, X_{I4}
	Fuc.ser.	—	—	—	X_2, X_3	X_4, X_5	X_9	X_6, X_7, X_8	X_{I3}, X_{I4}	X_{I2}, X_{II}, X_{II}
Mitochon-dries.	Pel.can.	—	—	—	X_3, X_4	X_2, X_5	X_6	X_8	—	X_{II}, X_{I4}
	Fuc.ves.	—	—	—	X_3, X_5	X_2, X_4	X_6	X_7, X_8	—	—
	Fuc.ser.	—	—	—	X_3, X_5	X_2, X_4	X_6	X_7, X_8	—	X_{II}, X_{I4}

Variations des teneur et composition des divers constituants au cours des saisons

Nota. P-E-A-H = printemps-été-automne-hiver - AGS/AGIS = rapport de proportion des acides gras saturés et insaturés - PL_T= phospholipides totaux - SL_T= Sulfolipides totaux - MonoP,MonoS = Monoesters phosphates,sulfates lipides.

leur ensemble.

. Acides gras constitutifs plus insaturés que ceux des lots témoins
Le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,28.

.Les monoesters phosphates du groupe 2 ont augmenté quantitativement et leur teneur est plus élevée que dans les lots témoins.Les monoesters sulfates ont aussi augmenté mais plus faiblement;les di,triesters phosphates diglycérides aussi,tandis que les polyesters sulfates ont diminué quantitativement.Les lipides du groupe I ont peu varié quant à leur teneur.

En résumé, les chloroplastes de P.canaliculata des lots d'automne sont plus riches en monoesters phosphates et sulfates,mais plus pauvres en polyesters sulfates.Les di et triesters phosphates ont aussi augmenté comparativement aux témoins mais faiblement.Les acides gras constitutifs sont potentiellement plus insaturés que ceux des témoins.

- Mitochondries.

Les mitochondries de P.canaliculata des lots d'automne sont plus riches en X_4 et X_5 que les lots témoins.Les X_2,X_3,X_6,X_8 n'ont pas changé quantitativement.Les acides gras constitutifs sont au même niveau de saturation potentielle que celui des témoins.

- Autres formations cytoplasmiques.

Les lipides de l'ensemble de ces formations ne sont pas modifiés notablement par rapport aux témoins,seuls les lipides de la série I ont diminué et ceci est sans doute dû au ralentissement des activités métaboliques des thalles en automne.

B. Fucus vesiculosus.

Les lipides de Fucus vesiculosus des lots d'automne ont aussi varié sensiblement mais dans l'ensemble ces variations ne diffèrent pas de beaucoup de celles des P.canaliculata pendant les mêmes périodes.Du point de vue général,les variations affectent faiblement les lipides polaires de la série I,les lipides polaires de la série 2 ont été par contre sensiblement remaniés.

Le groupe I de cette série a très peu varié par rapport aux témoins,les X_2,X_3 ont augmenté de 2% environ entre Septembre et Octobre mais leur teneur reste durant tout l'automne très voisine de la teneur normale (tableau X et XI).

Les lipides du groupe 2 ont gagné 8-I2% entre Septembre et Novembre puis se stabilisent autour d'une valeur de I0% supérieure à celle des témoins à partir de Décembre.Les X_6,X_7,X_8 augmentent de 6-9% dès le mois de Septembre et se maintiennent autour de 8% supérieurs aux témoins pendant toute la durée de l'automne.

Les lipides du groupe 3 ont diminué de 6-7% entre Septembre et Novembre leur teneur globale se stabilise autour de 6% inférieure à celle des témoins à partir de Décembre,et elle s'y maintient tant que dure la mauvaise saison.Les X_{I2},X_{II},$X_{II'}$ ont augmenté de 4% environ au début,puis ce taux devient constant à 3% supérieurs à celui des témoins entre Novembre et Décembre.Les X_{I3} ont augmenté de 2-3%,les X_{I4} au contraire diminué de 10-12% comparativement aux témoins.

Dans l'ensemble les phospholipides totaux ont augmenté en automne tandis que les sulfolipides totaux ont diminué.Les monoesters phosphates qui sont les plus touchés par ce remaniement,augmentent nettement.Les polyesters sulfates ont diminué,les polyesters phosphates ont faiblement augmenté comparativement aux témoins.Les monoesters sulfates par contre ont très peu varié.

Concernant les acides gras constitutifs,nous avons noté une insaturation potentielle de l'ensemble des lipides.Au niveau des groupes:ceux du groupe I ont un degré de saturation potentielle très peu différent de celle des témoins.Ceux du groupe 2 sont nettement plus insaturés que les témoins et ceux du groupe 3 aussi mais plus faiblement comparé au groupe 2.

Au niveau des organites cellulaires,les variations sont différentes d'une formation à l'autre. (tableau XI)

- Chloroplastes.

Les chloroplastes de F.vesiculosus des lots d'automne sont caractérisés par:

. Une teneur en lipides polaires du groupe 2 plus élevéeque celle du groupe 3.Le rapport LPh_TGr2/LS_TGr3 est de l'ordre de 0,70,celui des témoins étant 0,85

. Les monoesters sulfates et phosphates augmentent quantitativement par rapport aux témoins.Les Polyesters sulfates ont diminué parallèlement. Les lipides phosphorés du groupe I n'ont pas varié de façon sensible.

.Les acides gras constitutifs sont potentiellement plus insaturés dans les lots d'automne que dans les lots témoins.

- Mitochondries.

Les mitochondries des lots d'automne de F.vesiculosus sont peu différentes de celles des lots témoins quant à leur teneur et composition en lipides polaires,seuls les X_3 et X_5 ont légèrement augmenté,les acides gras constitutifs des lipides polaires des mitochondries de F. vesiculosus des lots d'automne sont potentiellement plus insaturés que ceux des témoins mais faiblement.

- Autres formations cytoplasmiques

En automne les teneur et composition en lipides polaires de ces formations sont quantitativement plus faibles que celles des témoins

notamment les lipides de la série I,ces derniers ont subi une baisse générale de 2-3% par rapport aux témoins.

C. Fucus serratus.

Des 3 algues F.serratus est celle dont l'équipement lipidique a le moins varié durant l'automne.Les teneurs en lipides polaires totaux ont diminué de 2-4% dès les premières semaines,puis à partir de Novembre se sont maintenues à environ 5% supérieurs à la normale et ceci durant les mauvaises saisons.Les phospholipides totaux ont augmenté de I-3% entre Septembre et Novembre,puis ils se sont stabilisés autour de 2% pendant tout l'automne.Les sulfolipides totaux au contraire ont diminué de 2-4% environ par rapport aux témoins.Les lipides de la série I diminuent quantitativement au début de l'automne,leur teneur peut baisser de 2-4% entre Septembre et Novembre,puis de 2% environ à partir de Décembre jusqu'à la fin de l'hiver.Les lipides de la série 2 ont subi eux aussi certains remaniements mais les variations de leur teneur sont souvent de faible amplitude.Au début de l'automne entre Septembre et Novembre aucune variation n'a été enregistrée,mais à partir de Novembre,les lipides du groupe 2 ont augmenté de 3-4%,se maintiennent autour de 4% à partir de Décembre,et ceci durant tout l'automne.Les X_6,X_7,X_8 ont augmenté de 2-3%,les X_9 de I,5% par rapport aux témoins.Les lipides du groupe I ont peu varié,seuls les X_2,X_3 ont une teneur légèrement supérieure à celle des témoins.Les lipides du groupe 3 ont subi une baisse quantitative de 3% environ et ce à partir de Décembre.Les X_{II} et $X_{II'}$ ont augmenté de I-2% comparativement aux témoins,les X_{I2}et X_{I3} ont diminué de 3% entre Décembre et Janvier,leur teneur reste basse par rapport aux témoins.Les X_{I4} ont diminué de 5-8% par rapport à la valeur normale. Le rapport des PL_T/LS_T reste voisin de 0,60 celui du groupe 2/groupe 3 est évalué à 0,63 approximativement.

Concernant les acides gras des LP_T nous avons noté une insaturation potentielle élevée par rapport aux témoins,pour l'ensemble des LP_T des lots d'automne.Au niveau des groupes les acides gras des lipides du groupe I ont un niveau de saturation proche de celui des témoins.Ceux du groupe 2 sont fortement insaturés,le rapport AGS/AGIS pouvant atteindre 0,20 pendant toute la durée de l'automne.Les lipides du groupe 3 ont aussi une insaturation potentielle élevée mais nettement inférieure à celle des lipides du groupe 2.

Au niveau des organites cellulaires,les variations suivantes ont été notées (tableaux X et XI):

- Chloroplastes.

Les chloroplastes de F.serratus des lots d'automne sont caractérisés par les particularités suivantes:

- Acides gras constitutifs particulièrement insaturés et l'insaturation potentielle atteint surtout les monoesters sulfates et phosphates des groupes 3 et 2.
- Rapport LPh_T/LS_T (groupe 2/groupe 3)plus élevé que celui des témoins,ce qui caractérise une forte teneur en lipides phosphorés du groupe 2 comparativement aux lipides soufrés du groupe 3 dans les lots d'automne.
- Abondance des monoesters sulfates et phosphates comparativement aux polyesters sulfates et phosphates lipidiques,et l'augmentation est très sensible dans les lots d'automne.

- Mitochondries.

Les mitochondries de F.serratus en automne sont peu différentes de celles des témoins quant à leurs teneurs et compositions.A part les X_4 et X_5 qui ont faiblement augmenté et une insaturation potentielle légèrement plus élevée de leurs acides gras,nous n'avons noté aucune modification significative des lipides polaires de ces organites dans les lots d'automne.

- Autres formations cytoplasmiques (AFCNCNM).

Concernant ces formations nous avons noté une faible diminution des lipides polaires de la série I ainsi qu'une insaturation potentielle moins élevée des acides gras constitutifs de certains de ces lipides.Ces diverses considérations contribuent à souligner l'activité ralentie du métabolisme entre Septembre et Décembre et plus généralement durant toute la mauvaise saison.

Conclusions.

L'étude de la variation des compositions et teneur en lipides polaires durant l'automne montre un remaniement très net de l'équipement lipidiques des 3 algues,et l'évolution se fait de la même façon quelle que soit l'espèce considérée.Dès les premiers jours de Septembre les acides gras constitutifs des lipides polaires tendent à devenir de plus en plus insaturés et l'insaturation potentielle s'établit au début d'Octobre jusqu'en Mars,les rapports AGS/AGIS varient selon les espèces mais toujours dans le même sens quelle que soit l'espèce considérée.Ensuite entre Octobre et Novembre les variations atteignent progressivement tous les lipides polaires,les lipides chloroplastiques sont les premiers remaniés quantitativement et qualitativement.Parmi eux les monoesters phosphates du groupe 2 subissent une augmentation quantitative rapide et plus ou moins importante.Les monoesters sulfates augmentent aussi mais plus faiblement.Les polyesters sulfates et phosphates des groupes 2 et 3 ont diminué parallèlement,et de manière plus ou moins importante selon les espèces.Le rapport des proportions molaires des $LPh_T Gr2/LS_T Gr3$ est caractéristique de l'espèce considérée.

La tendance à une diminution en lipides soufrés totaux et une augmentation en lipides phosphorés totaux entre Septembre et Décembre est très nette et ceci chez les 3 espèces d'algues.Les lipides du groupe I sont les seuls qui varient peu.La diminution quantitative de ces constituants,résulte chez les 3 espèces d'un ralentissement du métabolisme des thalles durant cette période.

Les lipides des chloroplastes étant fortement touchés et en premier par ces remaniements,dues aux variations quantitatives et qualitatives des lumières,indiquerait que les lipides polaires de ces organites participant à leur organisation infrastructurale,joueraient un rôle dans l'assimilation photosynthétique,très important.Par ailleurs l'automne caractérisé par une période relativement courte du jour par rapport à celle de la nuit,les lumières blanches naturelles sont moins abondantes.Cette déficience de la lumière justifierait une prédominance des lipides phosphorés totaux par rapport aux lipides soufrés totaux,ces derniers étant surtout fonctionnels en présence de la lumière blanche naturelle quantitativement importante.En outre en automne l'atmosphère est chargée de vapeur d'eau,celle-ci absorbe une plus ou moins grande quantité de lumière de grande longueur d'onde.La lumière résultante qui parvient au sol est alors quantitativement et qualitativement modifiée par cette absorption.les lumières de courtes longueurs d'ondes sont ainsi proportionnellement enrichies.

La diminution de la teneur en lumière de grande longueur d'onde pendant la période "Jour" provoquant l'augmentation des monoesters sulfates et phosphates lipidiques des chloroplastes entre Septembre et Décembre chez les 3 algues,soulignerait le caractère fonctionnel des monoesters sulfates et phosphates des groupes 2 et 3 à l'égard des lumières de grandes longueurs d'ondes.Par ailleurs la légère diminution des teneurs en polyesters sulfates et phosphates lipidiques des chloroplastes,laisse présager l'importance de ces polyesters sulfates et phosphates dans le fonctionnement des chloroplastes exposés aux lumières à courtes longueurs d'ondes.Nous avons déjà noté à diverses occasions la richesse relative en polyesters sulfates et phosphates des algues de profondeur telles que les F.serratus,ces derniers reçoivent quotidiennement des lumières à prédominance de courtes longueurs d'ondes surtout pendant les longues immersions.

Ainsi pendant l'automne les équipements lipidiques des 3 algues sont tous remaniés dans le même sens quant à leurs teneurs et composition en lipides polaires,tout en gardant leurs particularités liées à l'espèce.Les équipements en lipides polaires des 3 espèces pendant les mauvaises saisons tendent vers le modèle type proche de celui des Fucus serratus que nous désignerons par type "FS" établit ci-dessus principale-

ment au niveau des chloroplastes.

3) Lots récoltés entre Janvier et Mars.(lots d'hiver)

A. Pelvetia canaliculata (L).

Les lipides polaires de ces lots présentent les caractéristiques voisines de celles des lots d'automne et montrent une continuité dans l'évolution quant aux teneur et composition (tableaux X et XI).

. Les lipides de la série I ont subi une diminution de 3-4% par rapport à la valeur trouvée dans les lots d'automne et leurs taux restent à 6% environ inférieurs à ceux des témoins.

. Les lipides phosphorés totaux continuent à augmenter,atteignant un taux de I0% supérieur à celui des témoins entre Janvier et Février,puis diminue progressivement jusqu'en Mars.La teneur de X_2 et X_3 augmente de 6% jusqu'en Mars celle de X_4 et X_5reste au même niveau que celui des lots d'automne à $\pm$ 2% près.Les X_6,X_7,X_8 ont augmenté de I0% environ,une baisse s'amorce entre Février et Mars,lentement d'abord puis très vite après la mi-Mars.Les X_9 ont augmenté de 2% durant tout l'hiver.

. Les lipides soufrés totaux ont subi une baisse de I0% pendant tout l'hiver,les X_{II},X_{II},ont diminué de 3%,les X_{I2} ont augmenté de 2-3%,les X_{I3},X_{I4} ont diminué de 9-I0% entre Janvier et Février et leur teneur augmente au début de Mars plus lentement et plus régulièrement et ce jusqu'au printemps.

Pendant tout l'hiver le rapport des proportions molaires des LPh_T /LS_T de Pelvetia canaliculata se maintient autour de 0,96,celui de Gr2/Gr3 est de l'ordre de 0,69.

. Les acides gras des LP_T sont plus insaturés;le rapport AGS/AGIS de l'ensemble des lipides polaires est de l'ordre de 0,36.

Au niveau des différents groupes,nous avons noté le même degré de saturation potentielle du groupe I par rapport aux témoins,les groupes 2 et 3 au contraire sont très insaturés et le rapport AGS/AGIS peut atteindre 0,22 et 0,28 pour les 2 groupes respectivement.

En ce qui concerne les lipides polaires des divers organites cellulaires,nous avons noté les variations suivantes:

- Chloroplastes.

Les lipides des chloroplastes des lots d'hiver de P.canaliculata ont subi les mêmes variations que ceux des lots d'automne.

Les monoesters sulfates et phosphates ont augmenté par rapport aux témoins et sont toujours plus abondants que les polyesters sulfates et phosphates.Le rapport des proportions des LPh_T/LS_T (Gr2/Gr3) est évalué à 0,69-0,70 (tableaux X et XI).De même les lipides phosphorés totaux sont plus abondants que les lipides soufrés totaux.

Enfin les acides gras constitutifs des lipides polaires chloroplasti-

ques sont potentiellement insaturés;le rapport AGS/AGIS étant de l'ordre de 0,32 contre 0,36 pour les témoins.

- Mitochondries.

Les lipides des mitochondriés des lots d'hiver ont une teneur en X_4 et X_5 comparable à celle des lots d'automne,les X_2,X_3,X_6,X_8 au contraire augmentent de 2% par rapport aux témoins.Les acides gras des LP_T des mitochondries sont potentiellement plus insaturés que chez les témoins.

- Autres formations cytoplasmiques.

Dans l'ensemble les lipides polaires de ces formations n'ont pas été modifiées par rapport aux témoins,seuls les lipides polaires de la série I ont subi une baisse de 2-3% comparativement aux témoins,tout comme dans les lots d'automne.

B. Fucus vesiculosus.

Les lipides polaires de F.vesiculosus des lots d'hiver ont une composition et teneur en lipides polaires proches de celles des lots d'automne et très peu différentes de celles des lots de F.canaliculata récoltés durant les mêmes périodes.Les lipides de la première série ont diminué de 2-6%,ceux de la deuxième série sont remaniés assez profondément et de façon différente d'un lipide à l'autre.Les lipides phosphorés totaux sont relativement plus riches dans ces lots d'hiver. Les lipides soufrés totaux sont présents en plus faible quantité que les lipides phosphorés totaux.Parmi les lipides phosphorés du groupe I,les X_2 et les X_3 augmentent de 3% environ entre Décembre et Janvier et leurs taux se maintiennent supérieurs de 2,5% à ceux des témoins et ce jusqu'en Mars.Les X_4 et X_5 accusent une diminution de I% environ entre Décembre et Février,puis d'environ 2% de Février à Mars.Une augmentation s'amorce ensuite dès les dernières semaines de Mars,s'accentuant rapidement et peut dépasser de 4% celui des témoins,au printemps Les lipides du groupe 2 ont aussi augmenté de I0% jusqu'à la fin de l'hiver,les X_6,X_7,X_8 ont augmenté de 9-I2% entre Décembre et Février pour se stabiliser autour de I0%,à la fin de l'hiver.Pendant les dernières semaines de Mars ces lipides augmentent à nouveau de 2-3% pour enfin baisser progressivement au début de printemps.

Les lipides du groupe 3 subissent une baisse de 6% environ jusqu'au début de Mars puis augmentent peu à peu vers fin Mars,atteignant au début du printemps un taux de 3-4% supérieur à celui des témoins.Les taux des X_{II},X_{I2} baissent de 3%,ceux des X_{I3} et X_{I4} diminuent parallèlement de 8-I0%,pour ensuite augmenter de 3% supérieurs à ceux des témoins,début d'Avril.

Les acides gras constitutifs présentent un niveau d'insaturation poten-

tielle voisin de celui des acides gras des lots d'automne et ce,pour l'ensemble des lipides polaires.

Au niveau des organites cellulaires,les chloroplastes des lots d'hiver ont les mêmes caractéristiques que ceux des lots d'automne,les variations des teneur et composition ont lieu dans le même sens et de la même façon.

En résumé,les chloroplastes de F.vesiculosus des lots d'hi er sont caractérisés par:

- l'insaturation potentielle marquée des lipides polaires totaux
- la prédominance des lipides phosphorés totaux comparativement aux lipides soufrés totaux.
- abondance relative des monoesters sulfates et phosphates par rapport aux polyesters sulfates et phosphates.

. - Mitochondries

Concernant les mitochondries nous pouvons aussi faire les mêmes remarques que pour les chloroplastes.Les teneur et composition en lipides polaires sont comparables à celles des lots d'automne,et les acides gras constitutifs sont de même niveau de saturation potentielle.

- Autres formations cytoplasmiques.

Les lipides polaires des formations cytoplasmiques non chloroplastiques,non mitochondriales de F.vesiculosus des lots d'hiver n'ont pas changé par rapport aux lots d'automne,l'activité métabolique étant aussi très réduite en hiver qu'en automne,les conditions de luminosité locale étant très voisines pendant ces deux saisons.

C. Fucus serratus.

Ici les lipides polaires sont plus profondément remaniés durant l'hiver.Les lipides polaires totaux augmentent de Décembre à Janvier de 3-5% par rapport aux témoins et ce taux est maintenu jusqu'en Mars.Les lipides phosphorés augmentent en moyenne de 6-8% tandis que les lipides soufrés totaux diminuent de 3-4%.Le rapport des LPh_T/LS_T est de I,38-2,0 entre Février et Mars.

- Les lipides poaires de la première série baissent de 3 à4% entre Janvier et Février,mais une augmentation s'amorce vers la dernière semaine de Février atteignant un taux de 2% supérieur à celui des témoins durant la première semaine de Mars.
- Les lipides phosphorés du premier groupe augmentent de 2-2,5% durant tout l'hiver et parmi eux les X_2,X_3 acquièrent 3 à 4%,les autres varient peu par rapport aux témoins.
- Les lipides polaires du groupe 2 augmentent de 8 à 9% entre mi-Janvier et fin Mars.Les X_6,X_7,X_8 augmentent de 4-6%,les X_9 de 2-4% surtout en Février.
- Les lipides polaires du groupe 3 diminuent quantitativement de 4-5%

en hiver. Les X_{I2} augmentent de I0-I2%, les X_{I3}, X_{I4} ont diminué de 6% par rapport aux témoins. Les X_{II} et les $X_{II'}$ diminuent de 2-4% et ce entre mi-Février et fin Mars en général.

• Les acides gras constitutifs présentent une insaturation potentielle élevée pour les lipides polaires des groupes 2 et 3 surtout ceux qui constituent les chloroplastes; mais au niveau des lipides polaires totaux l'insaturation potentielle est nette sans être trop élevée par rapport aux témoins. Le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,25 en hiver.

Concernant les lipides polaires des organites cellulaires les variations sont les suivantes (tableau XI) :

- Chloroplastes.

Les chloroplastes de F. serratus des lots d'hiver portent les caractéristiques suivantes:

- Acides gras constitutifs fortement insaturés, surtout les acides gras des monoesters sulfates et phosphates diglycérides, des groupes 2 et 3.
- Rapport des LPh_T/LS_T élevé, caractérisant une teneur plus élevée en lipides phosphorés totaux qu'en lipides soufrés totaux.
- Prédominance des monoesters sulfates et phosphates lipidiques. Les polyesters sulfates et phosphates lipides sont moins abondants.

- Mitochondries.

Les mitochondries des lots d'hiver de F. serratus sont comparables à celles des lots d'automne en ce qui concerne leurs lipides polaires, toutefois les X_3, X_5 sont à un taux plus faible que dans les lots d'automne.

- Autres formations cytoplasmiques.

Concernant ces formations, les teneur et composition en lipides polaires sont peu différentes de celles des lots d'automne, surtout entre fin Février et début Mars. Les acides gras constitutifs de ces lipides polaires sont aussi potentiellement plus insaturés que ceux des lots d'automne. Les autres lipides sont comparables à ceux des lots d'automne quant à leur taux.

Conclusions.

Les lipides polaires des lots d'hiver des 3 algues étudiées ont des teneurs et compositions comparables à celles des lots d'automne, à peu de différences près.

Les variations les plus marquées des lipides polaires des lots d'hiver portent sur les constituants chloroplastiques. Ceux des mitochondries et d'autres formations cytoplasmiques n'ont subi que des variations peu importantes.

Concernant les lipides polaires des chloroplastes nous avons noté chez les 3 algues les caractéristiques suivantes:

I° Acides gras constitutifs potentiellement insaturés et les insaturations potentielles sont élevées comparativement à celles des témoins.

2° Lipides phosphorés totaux plus abondants que lipides soufrés totaux;les rapports des proportions des LPh_T/LS_T sont pour les 3 algues,nettement plus élevés que chez les témoins.

3° Augmentation sensible des monoesters sulfates et phosphates lipidiques des groupes 2 et 3;les polyesters sulfates et phosphates de ces mêmes groupes diminuent parallèlement.Les phosphatides du groupe I n'ont pas varié.

4° Les lipides de la série I ont tendance à diminuer quantitativement,ce qui dénote une activité métabolique très au ralenti pendant toute la durée de l'hiver.

4) Lots récoltés entre Avril et Juillet (lots de printemps).

A. Pelvetia canaliculata (L).

Les lipides polaires de ces lots sont caractérisés par une grande abondance en LP_T,ces derniers ont en effet augmenté de I0-I2% par rapport aux témoins.

- Les lipides phosphorés totaux diminuent faiblement au début d'Avril puis augmentent rapidement mais pendant une courte période entre Avril et début Mai.Entre Mai et Juin la teneur globale des lipides phosphorés atteint une valeur supérieure de 6-7% à celle des témoins pour enfin baisser rapidement durant la première semaine de Juin,se stabilisant à environ I% supérieure à la teneur des lots témoins.
- Les lipides de la deuxième série augmentent de 5-5,8% entre Mars et Avril puis de 7-8% jusqu'au début Juin et atteignent la teneur des lots témoins au début de Juillet.Les lipides du groupe I ont augmenté faiblement mais régulièrement entre Mars et Mai.Ce sont les X_2 et X_3 qui ont le plus augmenté,les X_4 et X_5 augmentent de 6-7%.Les lipides du groupe 2 augmentent considérablement au cours de cette période,surtout entre Avril et Juin,leur teneur a atteint une valeur de 6-8% supérieure à celle des témoins,puis baisse brutalement au début de Juillet revenant à la valeur moyenne des lots témoins,entre fin Juillet-début Août.Les X_6,X_7,X_8 sont les premiers et les plus affectés par ces variations.Les X_9 au contraire varient très peu au printemps mais une baisse progressive et continuelle est enregistrée entre Mars et Juin,atteignant la teneur des témoins dès la fin de Mai et s'y maintient jusqu'au début de l'automne.
- Il faut toutefois signaler la teneur plus faible en lipides phosphorés totaux comparée à celle des lipides soufrés totaux.Le rapport LPh_T/LS_T est de l'ordre de 0,75 dans les lots de printemps de P. canaliculata.Durant la période Mars-Juillet,les lipides soufrés de

P.canaliculata augmentent rapidement,leur taux peut atteindre une valeur de 8-I2% supérieure à celle des témoins.Les monoesters sulfates notamment les X_{I2},X_{II},$X_{II'}$,augmentent de IO-I2% du début de Mars à Mai puis baisse ensuite pour atteindre enfin les taux des lots témoins vers le début de Juillet.Les X_{I3},X_{I4} diminuent de 5-6% pendant les mêmes périodes.Leur taux atteint la valeur des lots témoins au début de Juillet généralement.

• Les acides gras constitutifs des lipides polaires totaux ont une nette tendance à la saturation potentielle.Au niveau des groupes les variations sont plus nuancées,moins caractéristiques.Les lipides du grpupe I sont très insaturés au début du printemps,mais entre Mai et Juin,leurs acides gras se saturent peu à peu et le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,36 à la fin de Juin.Les acides gras constitutifs des lipides du groupe 2 surtout les monoesters phosphates sont très insaturés entre Mars et Mai puis la teneur en acides gras insaturés baisse peu à peu entre Mai et Juin,et la saturation potentielle est marquée.Le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,28 à la fin de Juin pour ce groupe.Les acides gras des lipides polaires du groupe 3 restent faiblement insaturés durant tout le printemps:le rapport AGS/AGIS de ce groupe reste voisin de 0,34 entre Mars et Juillet,sans subir à aucun moment de variations notables. Concernant les lipides polaires des divers organites cellulaires les variations sont caractéristiques et diffèrent d'un organite à l'autre.

- Au niveau des chloroplastes les X_6,X_7,X_8 ont un taux moins élevé que celui des lots d'automne,mais un peu plus élevé par rapport aux témoins pendant tout le printemps.Les X_9 sont aussi présents dans les chloroplastes de Pelvetia canaliculata des lots de printemps,mais leur taux reste faible et une nette tendance à la diminution a été enregistrée entre Mai et Juin et qui se prolonge au delà de Juillet même.Les lipides polaires du groupe 3 ont diminué dans l'ensemble,seuls les X_{II} $X_{II'}$,X_{I2} ont augmenté de I-2% par rapport aux témoins,les X_{I3},X_{I4} ont sensiblement diminué et leur taux revient progressivement au même niveau que celui des témoins vers la fin de Juin.Les phosphatides du premier groupe ont aussi augmenté de 2% environ comparativement à ceux des chloroplastes des témoins en particulier les X_2 et les X_3

- Au niveau des mitochondries des lots de printemps de P. canaliculata,nous avons noté une augmentation sensible surtout au début du printemps du taux des lipides polaires totaux.Les acides gras constitutifs ont une tendance très nette à l'insaturation potentielle au début du printemps et cette insaturation persiste en général de Mars à Juin.

- Les autres formations cytoplasmiques (AFCNCNM) révèlent une insaturation potentielle très nette des acides gras de leurs différents lipides polaires surtout ceux de la série2.Le taux des acides gras de la

deuxième série des lipides polaires croit surtout entre Mars et Avril. Toutes ces considérations soulignent la variation ordonnée et très importante des teneur et composition en lipides polaires des thalles qui après une longue période de vie au ralenti, manifestent une intense reprise d'activité tant photosynthétique que métabolique, au niveau des lipides polaires.

Chez les P.canaliculata les remaniements sont très marqués et le "remodelage" des équipements lipidiques de cette espèce nous paraissent essentiels, indispensables aux exigences physiologiques nouvelles dues au retour du printemps.

B. Fucus vesiculosus.

Les teneur et composition en lipides polaires des lots de printemps de F.vesiculosus sont aussi fortement modifiées. Les lipides polaires totaux ont augmenté de 4-5% entre Mars et Avril puis de 6-8% jusqu'au début de Juin pour revenir progressivement à la valeur des taux des témoins dès la première semaine de Juillet. Les lipides phosphorés totaux ont augmenté de 6-8% au début puis entre Avril et Mai se stabilisent vers un taux de 10% supérieur à celui des témoins. La diminution progressive est ensuite amorcée lentement mais régulièrement pendant le mois de Juin pour revenir au taux normal. Les lipides de la série I augmentent de 3-4% et ce taux se maintient aux environs de 5% pendant toute la période de Mai à Juillet. Les X_2, X_3, X_4 et X_5 ont augmenté pendant cette même période de 3-4%. Les X_6, X_7, X_8 sont les plus affectés et entre Mars et Mai, leur taux est de 10-12% supérieur à celui des témoins. Entre Mai et Juin cette valeur diminue progressivement, pour redevenir identique à celle des témoins, début Juillet. Les lipides du groupe 3 diminuent dans l'ensemble de 4-5% entre Mars et Mai puis augmentent progressivement et lentement à partir de Juin; ils reviennent enfin au niveau des teneurs des témoins vers fin-Juillet, début Août. Les $X_{II'}$, X_{II}, X_{I2} croissent rapidement entre Mars et Avril et leur taux revient progressivement à celui des témoins dès le début de Mai généralement. Les X_{I3}, X_{I4} ont subi une baisse régulière, ils atteignent les valeurs des témoins au début Mai ou au plus tard à la première quinzaine de Juin. Le rapport des LPh_T/LS_T de Fucus vesiculosus des lots de printemps est de l'ordre de 0,96. Celui des Gr2/Gr3 est de 0,70.

Concernant les acides gras constitutifs des lipides polaires totaux, nous avons noté une insaturation nette au début du printemps mais progressivement la saturation potentielle s'établit et le rapport des AGS/AGIS des lipides polaires totaux des lots de printemps de F.vesiculosus est 0,39. Les acides gras du groupe I sont insaturés pendant toute la durée du printemps, leur rapport AGS/AGIS est alors évalué à 0,28 en

moyenne.Les rapports des acides gras des lipides des groupes 2 et 3 sont respectivement 0,32 et 0,36 entre Mars et Mai et 0,34-0,40 au début de l'été.

Concernant les divers organites cellulaires les variations suivantes ont été constatées (tableau XI):

- Chloroplastes.

Les lipides des chloroplastes des lots de printemps de F.vesiculosus sont relativement pauvres en polyesters sulfates et phosphates,les monoesters sulfates et phosphates dominent et parmi eux les monoesters sulfates sont majoritaires.Ces chloroplastes sont en outre riches en sulfolipides totaux,les phospholipides accusent un taux nettement moins élevé.Ve la fin de Juin les teneur et composition en lipides polaires des chloroplastes de F.vesiculosus sont presque identiques à celles des lots témoins

Concernant les acides gras constitutifs des lipides chloroplastiques de Fucus vesiculosus des lots de printemps nous avons enregistré une nette tendance à la saturation potentielle surtout vers fin Juin.

- Mitochondries.

Les mitochondries de Fucus vesiculosus des lots de printemps sont riches en lipides polaires.La teneur en lipides polaires est supérieure de 3 à 4% à celle des témoins.Les acides gras constitutifs sont potentiellement plus insaturés que ceux des témoins,mais la tendance à la saturation est nette entre Juin et début de Juillet pour l'ensemble des acides gras de ces lipides.

- Autres formations cytoplasmiquees (AFCNCNM).

Les lipides de ces formations se signalent par une teneur très élevée en lipides polaires de la série I.Pour les autres lipides les variations sont aussi élevées mais moins nettes.Les acides gras constitutifs des lipides polaires de ces formations sont plus insaturés que ceux des témoins et cela de Mars à Juin dans la plupart des cas.

C. Fucus serratus.

Les lipides polaires de Fucus serratus des lots de printemps subissent des variations nettes quant à leur teneur et composition,comparées à ceux des lots d'automne et d'hiver.Les lipides polaires totaux augmentent sensiblement entre Mars et Avril,leur taux peut dépasser de 7 à 8% ceux des témoins.Entre Mai et Juin la teneur en lipides polaires totaux se stabilise restant supérieure de 5% à celle des témoins. puis au début de Juillet une diminution se fait progressivement,atteignant les valeurs des lots témoins.

. Les phospholipides totaux ont diminué de 3-4% entre Mars et Mai pour

augmenter ensuite entre Mai et Juin, se stabilisant à I% au dessus du taux des lots témoins vers la fin de Juin ou au plus tard dès la première quinzaine de Juillet.

Les lipides du groupe I augmentent de 4% environ, les X_2, X_3 ont augmenté de 2-3%, les X_4, X_5 2% environ.

Les lipides du groupe 2 augmentent de 6-7% au début puis diminue peu à peu entre Mai et Juin. Les X_6, X_7, X_8 augmentent de 4-6%, les X_9 au contraire décroissent de 3-4% de Avril à Mai puis les taux de ces lipides reviennent peu à peu au niveau de la teneur des témoins à partir de la mi-Juin.

Les lipides soufrés totaux diminuent au début d'Avril de 7-8% pour augmenter à nouveau progressivement, atteignant les taux des témoins vers fin Juin et même plus tard. Les X_{I2}, X_{II}, $X_{II'}$ augmentent progressivement et se stabilisent autour de $\pm$ 2% par rapport aux témoins. Les X_{I3} et les X_{I4} diminuent parallèlement durant la même période, pour atteindre les teneurs des témoins vers le début de Juillet. Les X_{I5} augmentent sensiblement au printemps, les X_{I0} aussi mais cette augmentation quantitative est de faible amplitude. En résumé,

Les lipides polaires de Fucus serratus des lots de printemps sont caractérisés par une teneur en phospholipides totaux relativement plus élevée que pour les sulfolipides totaux, le rapport LPh_T/LS_T étant de l'ordre de I,78 celui des Gr2/Gr3 est voisin de I,27.

Les acides gras de ces lipides polaires accusent une tendance très nette à la saturation, le rapport AGS/AGIS reste toutefois voisin de 0,28 pour l'ensemble des LP_T. Les acides gras des lipides du groupe I sont fortement insaturés, ceux des groupes 2 et 3 sont au contraire plus saturés que ceux des lots témoins.

Concernant les divers organites cellulaires les teneur et composition en lipides polaires sont les suivantes:

- Chloroplastes.

Les chloroplastes des lots de printemps de F.serratus (L) sont caractérisés par la faible tendance à la saturation potentielle de leurs acides gras constitutifs, le rapport AGS/AGIS restant voisin de celui des témoins est évalué à 0,22 contre 0,20 chez les témoins.

En outre de la tendance à la saturation potentielle des acides gras constitutifs, nous avons aussi noté la prédominance des polyesters sulfates et phosphates par rapport aux monoesters . Les polyesters sulfates sont globalement moins abondants que les polyesters phosphates dans leur ensemble.

- Mitochondries.

Les mitochondries des lots de printemps de F.serratus sont riches en lipides polaires totaux.

Les taux en X_4 et X_5 accusent 4-5% de plus que ceux des témoins et cela surtout entre Avril et Mai.Dans ces lipides polaires des mitochondries les acides gras constitutifs sont très nettement insaturés.Le rapport AGS/AGIS est en moyenne de 0,22 et ceci tout au long du printemps.

- Autres formations cytoplasmiques.(AFCNCNM)

Ces formations sont aussi riches en lipides polaires,parmi eux les lipides de la série I sont nettement plus abondants que ceux des lots témoins,d'automne et d'hiver.Leurs acides gras sont aussi plus insaturés,le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,28

Conclusions.

Au cours des études précédentes,nous avons montré que chacune des trois algues [illegible] possède un équipement en lipides polaires [illegible] qui lui est propre,caractéristique de l'espèce,variable selon l'habitat des algues dans la mer, donc/ fonction de leurs conditions écologiques.
Les divers lipides polaires de chaque algue sont répartis de façon déterminée dans les organites cellulaires,où ils participent à leur organisation infrastructurale.
Les études de la variation des teneur et composition en lipides polaires en fonction des saisons,semblent indiquer que les qualités et quantités des lumières sont des facteurs déterminants,les constatations suivantes fournissent des preuves à l'appui de cette hypothèse.

I° Nous savons que les mauvaises saisons (automne et hiver) sont caractérisées par les"nuits" très longues et les"jours" plus courts (N>J).Les belles saisons (été-printemps) au contraire ont des périodes jours (J) plus longues que les périodes nuits (N):(N< J).Il en résulte que les lumières sont qualitativement et quantitativement différentes en automne et hiver [illegible]u printemps et été.En outre,l'atmosphère est chargée de vapeur d'eau pendant les mauvaises saisons,les lumières de grandes longueurs d'ondes sont de ce fait interceptées en grande partie par cet écran avant d'arriver au sol. Corrélativement,les lumières de courtes longueurs d'ondes sont proportionnellement plus concentrées.Les qualités de la lumière blanche naturelle sont de ce fait plus différentes comparativement à la lumière blanche complète des belles journées de printemps et d'été,dans laquelle les diverses lumières monochromatiques sont mieux équilibrées qualitativement et quantitativement.

2° En ce qui concerne les habitats des 3 espèces,nous savons

que les P.canaliculata et les F.vesiculosus occupent dans la mer et par rapport au littoral des zones plus ou moins exposées aux balancement quotidiens des marées.

Les quantités de lumières reçues quotidiennement par ces algues et par unités de surface quelle que soit la saison,sont relativement plus importantes que celles dispensées aux algues de plus grande profondeur, telles que les Fucus serratus.Celles-ci localisées au niveau le plus bas du littoral,vivent le plus souvent immergées sous l'eau.

Les lumières reçues quotidiennement sont de ce fait qualitativement différente de la lumière blanche complète et quantitativement moins abondante tant du point de vue de l'intensité que de la durée d'éclaiments.

Durant l'immersion les algues reçoivent surtout des lumières de courtes longueurs d'ondes,celles-ci sont proportionnellement importantes dans le complexe lumineux,puisque les lumières de grandes longueurs d'ondes ont été plus ou moins interceptées par la couche d'eau traversée.

3° Concernant les teneur et composition en lipides polaires des 3 espèces,nous avons signalé les principales caractéristiques de chacun des équipements types en lipides polaires de chacune des trois algues étudiées que nous résumons ci-dessous:

A. Pelvetia canaliculata.

- Saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires,surtout ceux des chloroplastes.
- Prédominance des lipides soufrés totaux sur les lipides phosphorés totaux.
- Richesse relative en monoesters sulfates et phosphates lipidiques;les polyesters sulfates et phosphates étant présents en plus faible quantités.

B. Fucus vesiculosus.

- Saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires totaux,en particulier,des lipides polaires chloroplastiques.
- Prédominance des lipides soufrés totaux sur les lipides phosphorés totaux.
- Richesse relative en monoesters sulfates et phosphates lipidiques;les polyesters sulfates et phosphates lipides étant minoritaires.

C. Fucus serratus.

- Insaturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires totaux et en particulier

des lipides chloroplastiques.

- Prédominance de lipides phosphorés totaux sur les sulfolipides totaux.
- Richesse relative en polyesters sulfates et phosphates lipidiques;les monoesters sulfates et phosphates lipidiques étant présents en plus faible quantité.

4° Compte tenu de leur habitat,les lipides polaires de P.canaliculata et de F.vesiculosus sont très proches quant à leur teneur et composition Leur équipement lipidique porte les mêmes caractéristiques,tout en conservant des particularités d'espèce. Fucus serratus contrairement aux 2 autres espèces décèle un équi pemnt en lipides polaires nettement différent,conforme semble-t-il aux conditions écologiques particulières dues à l'habitat de cette algue.

Nous avons pensé que la richesse en phospholipides totaux de Fucus serratus est due principalement à l'insuffisance quantitative et quasi permanente des lupières,tandis que la prédominance en sulfolipides totaux de P.canaliculata est corrélative à l'abondance de la lumière reçue.

Par ailleurs,la prédominance en polyesters sulfates et phosphates lipidiques des F.serratus peut-être due à la déficience en lumières de grandes longueurs d'ondes.La pauvreté en monoesters sulfates et phosphates lipidiques des F.serratus et la richesse relative de ces substances chez les P.canaliculata et F.vesiculosus seraient dues,vraisemblablement, à l'augmentation ou à la diminution des taux des lumières à courtes longueurs d'onde des éclairages dispensés .

Cette hypothèse nous paraît confirmée par l'étude de la variation des teneur et composition en lipides polaires au cours des saisons des 3 algues considérées.Il en résulte que les quantités et qualités de lumières sont déterminantes dans ces variations des teneurs et compositions en lipides polaires chez les 3 espèces considérées.En outre,il existe une certaine filiation dans la biosynthèse des différents lipides polaires d'une part et dans la formation d'autres substances chimiques dérivées des lipides polaires d'autre part.

Concernant l'effet de la lumière,nous avons été amené aux conditions suivantes:

I° En présence des lumières blanches naturelles qualitativement et quantitativement variables,les répercussions sur les teneur et composition en lipides polaires chez les 3 algues sont nettement définies.Ainsi dans le cas d'une lumière quantitativement insuffisante,dont la variation est de courte durée,les lipides

polaires sont remaniés superficiellement et de façon temporaire,seul le niveau d'insaturation potentielle est plus ou moins touché,selon l'importance de l'intensité et de la durée des variations de la lumière.

2° Si la variation de la lumière est quantitative et de plus longue durée,les remaiements de l'équipement lipidique seront plus profonds, affectant à la fois les teneur et composition de l'ensemble des lipides polaires.Dans ce cas si la période "obscure" est plus longue que la durée d'éclairement,ou bien pendant les saisons au cours desquelles la période "nuit" est plus longue que la période"jour" (N > J),les lipides phosphorés totaux sont fortement enrichis au détriment des lipides soufrés totaux,c'est ce qui se passe en automne et en hiver.Pendant ces deux saisons quelle que soit l'algue considérée,l'équipement lipidique varie toujours dans le sens de l'appauvrissement en sulfolipides totaux et de l'enrichissement corrélatif en lipides phosphorés totaux.En conséquence,les équipements lipidiques des 3 algues pendant les mauvaises saisons (type "hiver-automne")que nous désignons par T_{h-a} sont très proches de l'équipement lipidique de F.serratus désigné par T_{FS}.
Inversement,les équipements lipidiques remaniés des 3 algues au printemps et en été sont enrichis en sulfolipides totaux,les phospholipides totaux sont moins abondants.Les types printemps-été des équipements lipidiques des trois algues(T_{p-e}) sont proches du type modèle d'équipement en lipides polaires de P.canaliculata et F.vesiculosus,ceux-ci sont presque identiques aux particularités spécifiques de l'espèce près et désignés par T_{PC}.

3° Enfin dans le cas où seule la variation qualitative est en jeu la variation des teneurs et composition en lipides polaires est sélective et se fait selon la prédominance de lumière à grandes longueurs d'onde ou de celle des lumières à courtes longueurs d'onde dans les sources d'éclairages dispensées.Les polyesters sulfates ou les monoesters sulfates lipidiques augmentent en conséquence,et ce quelle que soit l'espèce considérée,ou diminuent.
Là aussi,le rapprochement vers le type T_{FS} ou T_{PC} est encore de règle, car les F.serratus de par leur habitat sont riches en polyesters sulfates et phosphates,les monoesters sulfates et phosphates lipidiques y sont présents mais en quantités nettement plus faibles.Les lumières dispensées à cette espèce sont enrichies en lumières à courtes longueurs

d'onde et proportionnellement pauvres en lumières de grandes longueurs d'onde.L'inverse se présente pour les P.canaliculata et Fucus vesiculosus.L'hypothèse selon laquelle les pâlyesters sulfates et phosphates lipides sont fonctionnels pour les lumières de grande longueur d'onde n'est pas à éliminer.Au cas où ces lumières sont abondantes,les teneurs en polyesters sulfates et phosphates lipides diminuent et inversement. Il en sera de même pour les monoesters sulfates et phosphates vis à vis des lumières à courtes longueurs d'onde.

En résumé,

Cas des variations quantitatives des lumières.

I° Variations de courtes durées.

.Variations du degré de la saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires,et plus particulièrement des lipides chloroplastiques .

2° Variations de longues durées.

.Variations des teneur et composition des lipides polaires totaux

- Cas où la durée de l'obscurité prédomine.

. Enrichissement en lipides phosphorés totaux et appauvrissement corrélatif en sulfolipides totaux.

- Cas où la durée des éclairages est plus longue.

. Enrichissement en lipides soufrés totaux et appauvrissement en lipides phosphorés totaux corrélativement.

Cas des variations qualitatives des lumières.

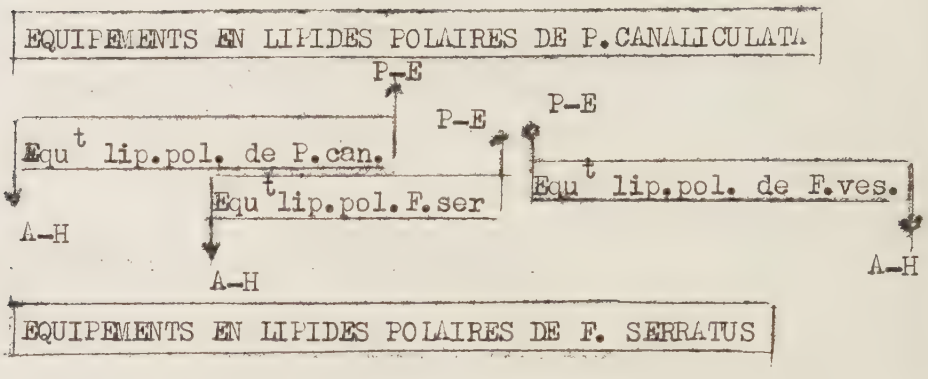
I° diminution des lumières de grandes longueurs d'onde dans les sources lumineuses

. Augmentations des teneurs en polyesters sulfates et phosphates et inversement.

2° diminutions des lumières de courtes longueurs d'onde dans les sources lumineuses.

. Augmentations des teneurs en monoesters sulfates et phosphates et inversement.

Résumé schématique des variations des teneur et composition des équipements en lipides polaires des trois algues au cours des saisons.



Nota. A = Automne H = Hiver P = Printemps E = Eté

II. - Etudes expérimentales des effets de certains facteurs écologiques sur les variations des teneur et composition en lipides polaires chez les trois algues

Ces études expérimentales nécessitent la mise en place de techniques de culture permettant la survie des thalles pendant au moins 4 à 5 semaines afin que les résultats soient exploitables. Tout d'abord: les thalles jeunes doivent être récoltés sans blessure au niveau des crampons, toute cassure produit, en effet, des traumatismes graves. Il faut alors prélever au burin un petit morceau du socle sur lequel sont fixés les crampons, afin de les garder intacts, si non les thalles ne peuvent survivre au delà du cinquième jours. Si la survie est plus longue, les lipides extraits alors des thalles endommagés sont en quantité très minime. De plus la composition en lipides polaires diffère totalement de celle des thalles normaux et aucune étude comparative n'est possible. Il semble en effet que les traumatismes au niveau des crampons même très légers, exigent pour la réparation de la blessure, des remaniements physiologiques si importants que l'ensemble des activités métaboliques s'intensifie de telle maière que , la récupération des lipides devient difficile, si non impossible, car dans les cultures expérimentales les conditions sont souvent défavorables. Les thalles entiers sont donc cultivés pendant une semaine dans des conditions les plus proches de la vie normale afin de les adapter progressivement. A cette fin les bacs de culture sont aménagés pour les rendre parfaitement bien aérés et oxygénés. Les renouvellements complets en eau de mer doivent en outre se faire continuellement. Pendant toute cette durée d'ad d'adaptation les périodes émersion/immersion seront parfaitement simulées, et selon les rythmes des marées journalières . Les éclairages naturels sont conservés durant cette première semaine pour favoriser encore l'adaptation rapide. Ensuite les cultures sont soumises progressivement aux éclairages artificiels, à raison de 6-8 h par jour, à l'aide d'un tube de néon (1m de longueur) et de deux lampes "FLOODS" latérales (100 Watts) chacune. Ces éclairages artificiels se font par périodes de 10h consécutives par 24 H. Pendant les périodes d'émersion, les lots de Pelvetia canaliculata et de Fucus vesiculosus doivent être fortement éclairés, deux lampes "FLOODS" supplémentaires ont été ajoutées durant 3-4 h con-

sécutives, et par jour. Les Fucus serratus sont moins exigeants et ne nécessitent pas ces éclairages supplémentaires. Dès que les cultures sont bien adaptées les expériences peuvent alors être menées sans risque. En principe les thalles parfaitement adaptés peuvent vivre presque normalement et même accomplir un cycle biologique normal comme dans la nature.Les analyses des lipides polaires montrent en outre que leurs taux et composition sont très proches de celles des témoins récoltés dans la nature.Les variations des teneur et composition sont assez comparables à celles des témoins.

1° Effets des lumières blanches artificielles

L'incidence de l'éclairage artificiel sur les teneurs et composition en lipuidespolaires est très peu perceptible. Comparativement à la lumière blanche naturelle, le système d'éclairage employé, décrit ci-dessus en est qualitativement et quantitativement proche. Les incidences de la lumière sur la biosynthèse des lipides polaires sont très peu marquées. Le profil de l'équipement lipuidique est presque normal chez les algues cultivées en lumière expérimentale. Cependant certaines différences ont été observées au niveau des trois algues en particulier lorsque les thalles cultivés étaient âgés. (tableau XII).

- Chez Pelvetia canaliculata: X_6,X_7,X_8 augmentent de 1-2 %, X_{12}, X_{11},X_{11}, au contraire diminuent de 3-4 %,mais les autres lipides n'ont subi aucune variation importante. Dans l'ensemble les lipides des chloroplastes sont les seuls à être quelque peu remaniés quand on utilise la lumière artificielle. Dans ces mêmes conditions de culture, les constituants lipidiques des autres organites cellulaires ne sont pas affectés ou alors très faiblement.

- Chez Fucus vesiculosus,les remaniements des lipides polaires provoqués par l'emploi de la lumière artificielle sont moins nets, mais apparemment ce sont encore les lipides des chloroplastes qui semblent les premiers et les plus touchés. Les fraction X_{12}, et X_{11} sont en fait les seules atteintes, leurs taux diminuent d'environ de 1-2 % comparativement aux témoins. Les X_6,X_7,X_8 diminuent de 1-1,5 % environ, les autres lipides ne subussent aucune variation.

TABLEAU XII

Variations des teneur et composition des lipides polaires en fonction de la lumière (lots Juin et Juillet)

Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux (ap)

Espèces		Helvetia canaliculata					Fucus vesiculosus					Fucus serratus				
Lipides		LN	LA	275 400	370 520	420 650	LN	LA	275 400	370 520	420 650	LN	LA	275 400	370 520	420 650
	X_I	1,00	1,00	1,00	1,04	1,04	1,50	1,50	1,53	1,52	1,55	2,00	2,00	2,00	2,10	2,04
rie I	X_{IO}	2,10	2,10	2,08	2,10	2,16	2,50	2,51	2,56	2,53	2,60	2,00	2,01	2,00	2,07	2,03
	X_{I5}	2,00	2,02	2,04	2,05	2,05	1,50	1,50	1,47	1,49	1,50	1,50	1,50	1,50	1,54	1,52
	X_2	1,00	1,00	1,00	0,95	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	2,51	2,50	2,50	2,47	2,55
	X_3	1,50	1,50	1,50	1,42	1,45	2,00	2,02	2,04	2,05	2,03	2,00	2,00	2,05	2,10	2,03
Gr1	X_4	2,00	2,00	2,01	2,00	1,95	1,50	1,50	1,52	1,53	1,49	1,50	1,50	1,55	1,58	1,53
	X_5	2,70	2,68	2,76	2,57	2,62	3,00	3,00	3,04	3,09	2,97	3,50	3,51	3,50	3,47	3,57
	X_6	2,00	2,05	1,87	1,86	2,04	3,30	3,34	3,30	3,23	3,31	1,00	1,00	0,90	0,97	0,95
Gr2	X_7	3,00	3,07	2,79	2,92	3,02	5,50	5,54	5,49	5,52	5,47	1,50	1,52	1,48	1,45	1,53
rie 2	X_8	5,00	5,04	4,90	4,90	5,05	6,50	6,61	6,47	6,62	6,54	2,50	2,54	2,47	2,46	2,52
	X_9	2,50	2,50	2,56	2,55	2,42	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	16,00	16,05	16,50	16,10	15,90
	X_{II}	2,50	2,45	2,47	2,45	2,51	2,50	2,47	2,25	2,55	2,52	1,50	1,50	1,47	1,45	1,86
	$X_{II'}$	3,00	2,98	2,95	3,02	2,91	5,00	4,79	4,55	5,20	5,05	1,00	0,97	1,00	1,00	1,92
Gr3	X_{I-}	20,00	19,80	19,45	20,05	21,00	14,00	13,25	13,80	14,30	14,25	2,00	2,01	1,97	1,95	2,54
	X_{I3}	3,00	2,98	3,10	3,02	2,90	1,00	1,00	1,04	1,00	0,95	10,00	10,02	10,14	10,50	9,90
	X_{I4}	2,00	2,10	2,05	1,89	1,92	1,00	1,00	1,05	0,97	0,94	2,51	2,50	2,54	2,35	2,48
/ICG LT(ap)		20,00	19,80	19,70	19,40	19,80	23,00	22,31	22,00	22,31	22,31	26,00	25,85	25,50	25,10	24,90
S/GIS		0,42	0,39	0,37	0,40	0,40	0,40	0,36	0,30	0,39	0,40	0,34	0,33	0,31	0,36	0,36

Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux avec pigments polaires (ap)

noP Gr2	10,00	10,16	9,26	9,38	10,21	15,30	15,54	15,16	15,18	15,34	5,00	5,08	4,85	4,88	5,01
noS Gr3	25,50	24,72	24,87	26,72	25,51	21,50	20,51	19,60	22,10	21,82	4,50	4,51	4,44	4,40	4,95
lyP Gr2	2,50	2,45	2,54	2,43	2,42	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	16,00	16,05	16,50	15,98	15,90
lyS Gr3	5,00	5,28	5,12	4,70	4,97	2,00	2,00	2,09	1,95	1,87	12,25	12,52	12,66	12,25	12,40
/LP_T(ap)	32,50	31,62	32,45	33,47	32,84	25,00	24,08	23,16	26,54	26,39	18,50	18,43	18,48	18,34	18,62
/LP_T(ap)	22,80	22,94	22,92	21,99	22,75	26,80	27,07	26,98	26,90	26,47	34,50	34,59	34,95	32,38	33,50

Nota. LN=Lumière naturelle-LA=Lumière artificielle-370....650nm = longueur d'onde des lumières.-PolyS,P,monoS,P=polyestersulfate,phosphate,monophosphate,sulfaté lipide LP=Lipides polaires-LT=lipides totaux-SL_T-PL_T=Sulfo et phospholipides toatux.

- Chez Fucus serratus, nous n'avons observé aucune modification notable: le profil général des lipides polaires reste comparable à celui des témoins , toutes proportions gardees, seule la teneur en lipides polaires totaux a augmenté de 1-2 % environ.
En ce qui concerne les acides gras des lipides polaires des trois algues, la lumière blanche artificielle provoque une très nette tendance à l'insaturation potentielle chez Pelvetia canaliculata et Fucus vesiculosus. Chez Fucus serratus la variation est moins nette, parfois inexistante.

En définitif nous pouvons confondre les teneurs et compositions en lipides polaires des algues cultivées en lumière artificielle et celles des témoins sans introduire de très grandes erreurs dans ces études comparatives .

2°- Etudes en lumière artificielle: effets de l'éclairage continu

A. Pelvetia canaliculata

L'éclairage continu est nocif à la culture des Pelvetia canaliculata, manifestement. Durant les 5 premiers jours d'expérience les cultures ne manifestent pas de signes apparents d'inconfort physiologique mais dès le 6 ème jour les incommodations apparaissent: les thalles pâlissent de plus en plus, prenant une couleur jaune orange, puis le blanchiment total des thalles survient vers 10-12 jours d'expérience. Les lipides totaux extraits entre les 2 ème et 5 ème jours de culture montrent une baisse notable des taux qui peuvent devenir de 8 à 12 % supérieurs à ceux des témoins. La baisse est amorcée ensuite au bout de cinq jours d'expérience, mais la teneur en sulfolipides totaux reste toujours supérieure de 2-3 % à la valeur normale elle se maintient encore pendant quatre à cinq jours puis diminue alors rapidement, atteignant la moitié de la teneur initiale après quinze jours d'éclairage continu . La mort des algues est irréversible après 15 jours de culture expérimentale. Les thalles ayant perdu d'abord leur turgescence, deviennent flasques, visqueux et presque blancs. Les fractions X_8, X_7, X_6 sont les premières remaniées et accusent une perte de 4-5 % durant les 5 premiers jours d'expérience, puis une augmentation de 1-2 % après le 6 ème jour de culture. Jusqu'à la mort des thalles les taux de ces lipides sont maintenus à 2 % environ au dessous de la normale. Les X_9 ont diminué quantitativement de 2-3 %, les autres lipides du groupe 2 marquent une dimi-

mution de 1 % ; ceux du groupe 1 ne varient de façon significative.

Les taux des sulfolipides totaux baissent d'environ 4-5 % durant les 6 premiers jours, puis augmentent les 8 ème et 10 ème jours de 6-8 %. Vers les 10e ,12e jours les sulfolipides totaux baissent très rapidement, vers le 15 ème jour d'étude il n'en reste plus que la moitié de la teneur initiale. Les X_{11} et les X_{12} sont manifestement les plus touchés, augmentant de 2 % , par rapport aux témoins, du 3 ème au 16 ème jour. Quant aux X_{13}, et X_{14} leur teneur baisse durant les 5 premiers jours se maintient inférieure de 6-7 % à la normale, jusqu'à la veille de la mort de la culture. Les lipides de la série I augmentent de 2-4 % par rapport aux temoins. Les lipides du groupe I diminuent régulièrement, puis faiblement à partir du 6ème jour de culture. Après le 13 ème jour ils sont encore présents, pour un taux égal à 60 % du taux initial. (v. tableaux XII et XIII).

L'analyse subséquente des sulfates non lipidiques révèle une perte sensible des sulfates polysaccharidiques des parois. Lente entre les 6 et 8 premiers jours d'expérience, puis brutale dès le 12 ème jour, la teneur en sulfates polysaccharidiques est alors tombée à la moitié de sa valeur initiale. La perte galopante en sulfates polysaccharidiques se traduit par une diminution de la turgescence des thalles. Ceux-ci ayant perdu leur capacité de rétention d'eau consécutive à la perte de sulfates par les parois de ces thalles. Outre la perte de turgescence, le blanchiment s'accélère préludant à la mort définitive des thalles. Signalons que la perte en sulfates polysaccharidiques est caractérisée par l'incapacité totale des thalles à incorporer ces sulfates ; leur élimination dans le milieu de culture est abondante elle correspond à une "hémorragie" typique,.

B. Fucus vesiculosus

Chez F.vesiculosus les mêmes signes d'incommodation apparaissent très tôt, mais la résistance à la nocivité de l'éclairage continu est plus efficace apparemment. Dès les premiers jours de culture expérimentale les thalles se montrent peu turgescents, la couleur vert olive s'estompe laissant peu à peu la place à un vert pâle persistant 8 à 10 jours avant le blanchiment définitif.

Le dosage des lipides polaires durant les premiers jours de l'expérience montre une augmentation de 1-3 % puis de 8 % au 6 ème

TABLEAU XIII

Variations des teneur et composition des lipides polaires en cultures expérimentales sans alternances rythmées de lumière/obscurité et émersion/immersion.

Espèces	Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux avec pigments polaires(LP)														
Lipides	Pelvetia canaliculata					Fucus vesiculosus					Fucus serratus				
	T_{LA}	E_c	O_p	I_c	Em_p	T_{LA}	E_c	O_p	I_c	Em_p	T_{LA}	E_c	O_p	I_c	Em_p
X_1	I,00	I,04	0,98	I,02	I,03	I,50	I,46	I,54	I,56	I,58	2,00	I,98	2,08	2,06	2,06
riel X_{10}	2,10	2,20	2,05	2,25	2,15	2,51	2,44	2,55	2,52	2,69	2,01	2,00	2,10	2,08	2,14
X_{15}	2,02	2,09	2,00	2,08	2,07	I,50	I,48	I,51	I,53	2,00	I,50	I,47	I,54	I,57	I,56
X_2	I,00	0,95	I,05	0,98	I,00	I,00	0,94	I,02	I,08	I,00	4,50	4,45	2,42	2,55	2,50
GrI X_3	I,50	I,30	I,54	I,49	I,51	2,02	2,00	2,06	2,03	2,10	2,00	I,96	I,92	2,01	2,08
X_4	2,00	I,88	2,03	2,08	2,08	I,50	I,47	I,52	I,58	I,52	I,50	I,46	I,47	I,53	I,51
X_5	2,68	2,60	2,72	2,74	2,75	3,00	2,92	3,06	3,01	3,08	3,51	3,47	3,45	3,51	3,62
X_6	2,05	2,10	2,05	2,00	2,10	3,34	3,38	3,25	3,10	3,34	I,00	0,97	0,98	0,98	I,05
X_7	3,07	3,15	2,72	3,01	3,12	5,59	5,61	5,42	5,12	5,60	I,53	I,65	I,51	I,50	I,60
Gr2 X_8	5,04	5,15	4,48	5,02	5,19	6,61	6,80	6,47	6,10	6,80	2,54	2,40	2,57	2,49	2,64
X_9	2,50	2,40	2,65	2,70	2,15	0,00	0,00	0,25	0,27	0,00	I6,05	I5,10	I5,1-	I6,70	I4,69
riel X_{11}	2,45	2,50	2,31	2,30	2,50	2,47	2,63	2,42	2,-5	2,60	I,50	I,60	I,47	I,43	I,58
$X_{11'}$	2,98	3,08	2,90	2,78	3,05	4,78	5,04	4,61	4,20	5,02	I,00	I,08	0,98	0,97	I,06
Gr3 X_{12}	I9,30	I9,80	I9,10	I8,20	I9,90	I3,25	I4,02	I3,10	I2,20	I4,00	2,01	I,80	I,97	I,96	2,15
X_{13}	2,98	2,70	3,00	3,02	2,90	I,00	0,90	I,05	I,08	0,70	I0,02	9,60	I0,25	I0,33	9,00
X_{14}	2,00	I,88	2,06	2,04	I,96	I,00	0,94	I,06	I,10	0,72	2,50	2,23	2,58	2,56	2,20
S/AGIS LP_m	0,39	0,42	0,36	0,35	0,42	0,36	0,40	0,39	0,34	0,40	0,33	0,36	0,33	0,33	0,37
/100g LT_p	I9,80	I9,50	20,10	20,00	I9,50	22,30	22,05	22,35	22,40	22,00	25,85	25,15	25,91	25,86	25,50

	Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux avec pigments polaires(LP)														
SL_T	31,54	32,16	31,41	28,45	32,38	24,08	24,90	23,45	24,60	25,24	I8,53	I7,61	I8,20	I8,44	I8,58
PL_p	24,94	25,70	25,37	23,23	23,00	27,17	27,00	27,34	27,36	26,71	34,55	34,43	34,62	35,33	33,89
noS Gr3	24,74	25,38	24,35	23,49	25,45	20,51	21,66	19,82	16,55	21,62	4,51	4,57	4,42	4,36	4,79
nol Gr2	I0,16	I0,40	9,45	8,03	I0,41	I5,54	I5,79	I5,14	I4,34	I5,74	5,08	5,10	5,06	4,97	5,25
lyS Gr3	4,98	4,58	5,06	5,06	4,86	2,00	I,82	2,11	2,18	I,44	I2,54	II,83	I2,03	I2,85	II,20
lyP Gr2	2,45	2,40	2,65	2,70	2,15	0,00	0,00	0,25	0,27	0,00	I6,05	I5,10	I6,12	I6,70	I4,69

Nota. T_{LA}=Témoins avec éclairage en lumière artificielle complète
E^{LA}_c= Eclairage continu- O_p= obscurité permanente-I_c=Immersion continue
Em_p= Emersion permanente.
SL^p_T , PL_p= sulfo et phospholipides totaux-Monol,S=monoester sulfate et phosphate lipides-Polyl,S=Polyphosphates et sulfates lipides.-LI_p= lipides polaires totaux

jour d'expérience pour les fractions X_{12},X_{11},$X_{11'}$. La diminution s'amorce ensuite dès le 8 ème jour d'expérience, et après 12 jours de culture, les algues qui ont survécu ne contiennent plus que les 2/3 des teneurs initiales. Les X_{13}, et les X_{14} diminuent de 2-3 % pendant la même période. Les X_6,X_7,X_8, subissent une augmentation de 2 % dès le troisième jour d'expérience, cette augmentation continue faiblement jusqu'au 6 ème jour, mais à la veille de la mort de la culture on n'y trouve plus que 40 % environ du taux initial de ces lipides. Les autres lipides du groupe 2 diminuent de 3-4 %. Les lipides de la série I subissent une perte de 2-4 % après 4 jours de culture experimentale mais ces variations quantitatives ont lieu de façon désordonnée, difficilement interprétable. Les "hémorragies" en sulfates polysaccharidiques des parois précèdant le blanchiment des thalles, ainsi que la perte de la turgescence de ces derniers sont aussi observés chez Fucus vesiculosus mais ces symptômes sont de plus faible ampleur que chez Pelvetia canaliculata (tableau XIII)

C. Fucus serratus

L'effet nocif de l'éclairage continu est ici nettement plus marqué que sur les deux espèces précedentes. Les cultures sont peu vigoureuses et la plupart des thalles ne peuvent survivre au delà de dix jours d'expérience. Les survivants, environ 1/5, sont morphologiquement frêles, de couleur vert pâle et les thalles sont faiblement turgescents.

Le dosage des lipides polaires totaux montre la perturbation totale de leurs teneur et composition. Les phospholipides totaux augmentent faiblement au début puis très vite dès le 7e jour de culture une diminution s'installe, le taux atteignant alors une valeur de 15-20 % inférieure à la normale. Les plus touchés des lipides phosphorés sont les X_9 et les X_8 qui ont perdu 4-6 % au début de l'expérience puis plus de la moitié, après le 8 ème jour. Ce chiffre se maintient toutefois jusqu'à la mort de la culture, survenant, au plus tard, vers le 15e jour de culture expérimentale en éclairage continu. Les X_7,X_6 ainsi que les autres lipides polaires du groupe I subissent quelques variations, mais de moindre importance. On note une diminution quantitative de 3 % environ les 6 ème et 15 ème jour de l'expérience. Les lipides du groupe I

subissent une diminution de 2 % comparativement aux témoins.

Les sulfolipides de ces mêmes algues subissent des diminutions lentes d'abord puis de plus en plus importantes. Après 8 jours d'expérience on n'enregistre plus que 80 % de leur teneur initiale. Les fraction X_{12}.X_{13} et les X_{14} sont les premières et les plus touchées, elles ont perdu 14-15 % de leur teneur après 8 jours d'expérience. Les autres lipides polaires ont été remaniés aussi mais plus faiblement du moins au début de l'expérience, notamment les lipides polaires de la série I. (tableauXIII). Enfin chez Fucus serratus nous avons noté aussi une "hémorragie" abondante en sulfates polysaccharidiques qui débutant vers le 5 ème jour de l'expérience, atteint son paroxysme vers le 8éme jour, mais la perte de la capacité de retention d'eau se manifestente déjà dès le 4 ème jour de culture expérimentale.

Les acides gras constitutifs des lipides polaires manifestent, au cours de ces expériences, une nette tendance à la saturation potentielle et ceci quelle que soit l'espèce considérée. Cette tendance à la saturation s'estompe après le 6 ème jour laissant la place à une insaturation qui s'accentue rapidement jusqu'au 10 ème jour et qui précède leur dégradation rapide. Les acides gras trouvés après 6 jours d'expérience sont composés principalement d'acides: décanoïque (caprique), dodécanoïque (laurique) et un peu de tétradécanoïque (myristique). Tous ces acides ne sont présents qu'à l'état de trace en temps normal; dans l'expérience sous éclairages continus, ils deviennent plus abondants, provenant sans doute de la dégradation des acides gras des divers lipides polaires. A côté de ces acides gras à plus courtes chaînes aliphatiques, les acides hexadécenoïque (palmitolèique) sont aussi présents en quantité non négligeable, surtout après le 8 ème jour de l'expérience. De même les acides gras tétradécénoïques sont identifiables vers le 9 ème jour de culture expérimentale, mais souvent en faible quantité, à moins que ce ne soient les formes "iso" d'acides gras non identifiés; cette hypothèse n'est pas vérifiée mais elle n'est pas à écarter à priori.

3° - Effets de l'obscurite permanente, et totale

A. Pelvetia canaliculata

L'obscurité totale et permanente est très nocive pour Pelvesia canaliculata, ces algues supportent mal l'absence de lumière. Dès les premiers jours de l'expérience, la culture présente des symptômes "d'essoufflement" caractéristiques, les thalles se flétrissent

restent vert-olive, mais vers les 4e-5e jours cette couleur naturelle s'estompe rapidement et la mort commence à partir du 8 ème jour de culture.L'analyse des lipides polaires montre une augmentation de 3-4 % des phospholipides totaux entre les 2 ème et 4 ème jours de l'expérience. La baisse s'amorce ensuite s'installant lentement jusqu'au 10 ème jour, enfin la chute brutale s'observe après le 12 ème jour de culture. Les X_6,X_7,X_8 sont remaniés en premier,une augmentation de 8-10 % a été constatée dès le quatrième jour, puis une baisse régulière entre le 9 ème et 12 ème jour, atteignant une valeur de 12 % inférieure à la normale vers le 14 ème jour de l'expérience. Les X_9 ainsi que les lipides du groupe I maintiennent leurs taux normaux durant les 4-5 premiers jours, mais vers le 6e jour une augmentation de 4 % environ a été enregistrée. Au 12 e jour il ne reste plus que 80-82 % de la quantité initiale de ces lipides. Les lipides soufrés totaux augmentent dès le 2 ème jour de 3 % environ puis leur baisse commence entre les 3 ème et 8 ème jours, atteignant 4-5 % au dessous de la normale. Une baisse brutale s'établit ensuite après 10 jours de culture, accusant une perte de 25-30 %; les X_{12},X_{11},X_{11}, sont les plus atteints ils ont perdu 8-10 % entre le 3 ème et le 10 ème jours de l'expérience. Les X_{13} et les X_{14} ont subi une augmentation de 2 % à partir du 5 ème jour de culture expérimentale, puis la baisse s'accentue et au 10 ème jour on ne trouve plus que 30 % de leur teneur initiale.

Les lipides de la première série ont fortement augmenté durant les 5 premiers jours, puis leur taux diminue rapidement après le 8 ème jour, atteignant une valeur de 2-4 % inférieurs à la normale à la mort de la culture.
Concernant les acides gras constitutifs les dipides polaires nous avons noté au cours de cette expérience une tendance très nette à l'insaturation potentielle, et les dégradations débutent 48 h avant la mort généralisée des thalles.

B. - Fucus vesiculosus

Les Fucus vesiculosus subissent des variations identiques à celles des Pelvetia canaliculata . Chez cette espèce les lipides phosphorés totaux ont aussi augmenté rapidement durant lestrois premiers jours de l'expérience, atteignant un taux de 6-7 % supérieur à la normale, pour baisser apres 8-10 jours de culture expé-

rimentale, lentement mais régulièrement. A la mort de la culture on trouve encore 60 % des lipides initiaux. Les X_6, X_7, X_8 sont fortement atteints par ces remaniements dès les 5 premiers jours de l'expérience il perdent 2 % , la baisse de teneur en ces lipides se poursuit lentement jusqu'à la mort des thalles. Les lipides du groupe I ont subi une augmentation de 2 % du 5 ème au 10 ème jour de l'expérience puis diminue et ceci s'accélère jusqu'à la mort des thalles. Mais à la veille de la mort de la culture on trouve encore 40 % environ des lipides initiaux. Les lipides soufrés totaux diminuent après 5 jours de culture, leur taux devient inférieur/ 6-7 % à la normale vers le 20 ème jour. Une baisse brutale a été enregistrée dès le 12 ème jour, prélude de la mort de la culture. Les X_{12}, X_{11}, X_{11}, baissent de 4-5 % par rapport à la normale, les X_{13}, X_{14} ont au contraire augmenté de 2 % , mais à la veille de la mort des thalles les lipides soufrés totaux ne sont plus représentés que par 40 % de la teneur initiale. Les lipides de la première série ont augmenté de 4-5 % au début et ce taux se maintient à 3 % au dessus de la normale à partir du 4 ème jour de culture et jusqu'à la mort de la culture. (tableaux XII et XIII). Concernant les acides gras constitutifs nous avons aussi observé une tendance nette à l'insaturation potentielle durant toute l'expérience.

C. - Fucus serratus

Les Fucus serratus sont celles qui supportent le mieux l'obscurité totale et permanente. Durant les premiers jours d'étude, les thalles deviennent moins turgescents et de couleur plus terne. Pendant cette période d'adaptation de nombreux thalles meurent mais les survivants se maintiennent, après 5-6 jours d'inconfort physiologique incontestable.

L'analyse des lipides polaires montre une faible variation de la teneur en lipides polaires totaux. Une augmentation lente a été notée toutefois pendant les 6 premiers jours, leur valeur se stabilise autour de 2 % au dessus de la normale, entre le 8 ème et le 15 ème jour de culture. Les lipides phosphorés totaux restent de valeur identique à celles des teneurs au départ, mais vers le 6 ème jour une augmentation de 2,5 % est enregistrée, ce chiffre se maintient jusqu'à la veille de la mort de la culture. Les X_9 et les X_8 sont les seuls lipides du groupe 2 remaniés pendant cette

période ils augmentent de 2 % environ par rapport à la normale, les autres lipides de ce groupe ainsi que les lipides du groupe I gardent les mêmes quantites jusqu'au 8 ème jour, puis une diminution lente et progressive est amorcée atteigant 5 % au dessous de la normale au bout de 15 jours d'expérience. Celle-ci se poursuit jusqu'à la mort de la culture. Les lipides soufrés totaux varient peu mais dès les 5 premiers jours de culture on enregistre une baisse de 3 % . Cette teneur se maintient jusqu'au 12 ème jour de culture expérimentale, puis 48 h avant la mort des thalles une chute brutale est enregistree, et la culture déperit très vite. Les X_{13},X_{14} augmentent de 2-3 %, les X_{12},X_{11} baissent de 3 % par rapport à la normale, les autres lipides ont été très peu affectés. Les lipides de la série I augmentent de 3-4 % durant toute la durée de l'expérience, et ce dès le 3 ème jour de l'expérience.

Les acides gras constitutifs des lipides polaires totaux ont une nette tendance à l'insaturation pendant toute la durée de l'expérience. Les sulfates polysaccharidiques des parois des thalles sont soumis à une "hemorragie" importante, précédant la mort de la culture. Cette hémorragie en sulfates est néanmoins plus lente et de plus faible amplitude que celle des deux premières espèces soumises à l'obscurité totale et permanente. (tableaux XII et XIII).

Conclusions

La forte nocivité de l'éclairage continu et de l'obscurité permanente et ses incidences sur les variations de teneur et composition en lipides polaires sont très nettes au niveau des trois espèces. Ces effets nocifs se manifestent de plusieurs manières et quelle que soit l'espèce nous avons noté en premier lieu une augmentation de la teneur en lipides phosphorés totaux et une diminution parallèle en lipides soufrés totaux. Puis la nette tendance à la saturation potentielle des acides gras constitutifs est enregistrée chez les trois algues, l'amplitude des variations est toutefois différente selon l'espèce considérée. En troisième lieu: l'hémorragie abondante en sulfates polysaccharidiques marquant la mort des thalles, est de règle quelle que soit l'espèce considérée. Enfin nous avons encore noté que les lipides polaires majoritaires des chloroplastes sont les plus profondément remaniés et généralement une augmentation relative des teneurs en sulfates

et phosphates a été constatée chez les trois espèces. Dans le cas de l'obscurité permanente: les teneurs en polyesters phosphates augmentent fortement celles des polyesters sulfates également mais beaucoup plus faiblement. Ces faits démontrent que les lipides polaires participent étroitement à l'organisation infrastructurale des divers organites cellulaires, que le métabolisme de ces lipides phosphorés et soufrés est dependant manifestement des différentes lumières.

En résumé, les effets de l'éclairage continu ou de l'obscurité permanente sur les variations des teneur et composition en lipides polaires chez les trois espèces considerées sont les suivantes:

- Eclairage continu

  . Saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires quelle que soit l'espèce considérée.
  . Diminution de la teneur en lipides polaires totaux
  . Augmentation de la teneur en lipides soufrés totaux et diminution parallèle des lipides phosphorés totaux, ceci ches les 3 algues
  . Augmentation sensible en monoesters sulfates, mais moindre pour les monoesters phosphates. Les teneurs en polyesters sulfates et phosphates lipides au contraire diminuent.

- Obscurite permanente

  . Insaturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires des trois algues.
  . Augmentation de la teneur en lipides polaires totaux
  . Diminution des teneurs des lipides polaires soufrés totaux et augmentation de celles des lipides polaires phosphorés totaux
  . Augmentation importante en polyesters phosphates, moindre pour les polyesters sulfates. Les valeurs des monoesters sulfates et phosphates diminuent

4° - Effets des lumières artificielles sur les variabilités des teneur et composition en lipides polaires

Nous avons vu que la lumière artificielle peut remplacer efficacement la lumière naturelle, à la condition qu'elle soit qualitativement et quantitativement proche de la lumière blanche naturelle.

Les variations des teneur et composition en lipides polaires sont très faibles et le profil des lipides polaires des trois algues peut être confondu avec celui des algues provenant de leur milieu naturel.Les remaniements des équipements lipidiques des trois algues sont superficiels lorsque les lumières utilisées sont moins intenses que la lumière naturelle . et si les variations quantitatives des éclairages sont de courtes durées. Dans ce cas, seul le degrè de saturation potentielle des acides gras constitutifs paraît répondre, et selon l'ampleur des variations des sources lumineuses. Par contre si les variations quantitatives des lumières sont très importantes et de longues durées: les teneurs en lipides polaires sont modifiées plus profondément. Mais si les varaitions lumineuses sont seulement qualitatives: les modifications des teneur et composition en lipides polaires, le profil général de l'équipement en lipide polaires sont plus ou moins bouleversés. Afin de déterminer les effets de la lumière sur les variations des teneurs et composition en lipides polaires chez les trois algues etudiées des cultures experimentales ont été établies en présence 1) de lumières plus ou moins intenses 2) des lumières filtrées sélectivement ceci pour preciser qu'elles sont les incidences dues : 1) aux qualités des lumières -2) à l'intensite des sources d'éclairage..

1 - Variations quantitatives des lumières

Pour cette etude il faut déterminer les quantités de "lux/heure par unité de surface des thalles". Il a été impossible de procéder à cette méthode empirique par défaut d'appareillage . Seules des vaiations d'intensité des sources d'éclairages employées, furent obtenues par un rhéostat. Considérant les teneur et composition en lipides polaires des algues ainsi exposees nous essaierons d'observer quels effets sont dus: à la qualité d'une part et à la quantité de lumière en tant que source photonique et énergétique, d'autre part.

Des résultats obtenus nous pouvons tirer les conclusions suivantes

1° - Cas des éclairages de 3 Ampères 220 volts (P= 650 watts)

Comparativement aux éclairages des lots temoins (de puissance 400 watts environ) nous avons noté les différences suivantes: Pelvetia canaliculata, les lipides polaires des lots soumis pendant 15 jours aux eclairages artificiels lumière blanche, de

650 watts portent les caractéristiques suivantes:

1) Tendance à la saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires. Le rapport AGS/AGIS est évalué à 0,42 contre 0,39 pour les témoins.
2) Lipides totaux en quantités plus faibles par rapport aux témoins. Ils tendent à plafonner après 10 jours d'expérience, au taux de 4-4,5 % inférieur à celui des témoins.
3) Augmentation faible en lipides soufrés totaux et diminution parallèle en lipides phosphorés totaux. Le rapport des LPh_T/LS_T est de l'ordre de 0,50 (0,58 pour les témoins) le rapport des lipides polaires Gr2/ lipides polaires Gr3 reste très proche de celui des témoins: 0,435 contre 0,44 pour cette espèce normalement.
4) Les taux en mono et polyesters sulfates et Phosphates des Gr2 et Gr3 ont diminué quantitativement par rapport aux témoins.

Fucus vesiculosus, ici les variations des teneur et composition en lipides polaires, portent aussi sur une diminution en lipides polaires totaux d'une part, sur la saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires de cette espèce. Le rapport AGS/AGIS des lipides polaires totaux est de 0,40 contre 0,36. Les rapport LPh_T/LS_T est de 1,12 contre 1,02 pour les témoins. Les rapports LD du Gr2/ LP du Gr3 est de 0, 795 contre 0,80. Ceci s'explique par le fait que si les lipides polaires du groupe I augmentent de 4-6 % les teneurs en lipides du groupe 2 diminuent quantitativement de 1-1,5 %. Les monoesters phosphates diminuent globalement de 1 % par rapport aux témoins mais leurs taux/ respectifs restent toujours dans des proportions identiques comparativement aux témoins. Il en est de même pour les polyesters sulfates et phosphates lipides, ceci a déjà été observé ci-dessus chez Pelvetia canaliculata.

Fucus serratus Une tendance nette à la saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires s'installe. Le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,38 contre 0,33 chez les témoins. Les lipides polaires totaux diminuent de 3 % comparativement aux témoins. Les teneurs en lipides soufrés totaux augmentent de 2-4 % celles des lipides phosphorés totaux baissent de 5 %. Les lipides polaires du groupe I gagnent de 2%; les lipides po-

laires du groupe 2 perdent 4 % environ. Le rapport des proportions des LPh_T/LS_T est de 1,34 contre 1,38 pour les témoins. Celui des lipides polaires du groupe 2/ lipides polaires du groupe 3 est de 1,236 contre 1,24 pour les témoins. Pour les monoesters sulfates et phosphates les proportions restent inchangées; de meme pour les polyesters sulfates et phosphates, le profil de répartition de ces lipides est identique à celui des témoins.

En résumé

Quelle que soit l'algue mise en culture experimentale (présence de lumières de forte intensité: 650 watts), les var iations des teneur et composition en lipides polaires sont les suivantes:

. Saturation potentielle des acides gras constitutifs lipides polaires totaux, surtout ceux des chloroplastes.

. diminution quantitative en lipides polaires totaux.

. augmentation des lipides soufres totaux et diminution parallèle en lipides phosphorés totaux.

. diminution quantitative des mono et polyesters phosphates du Gr 2. Il en est de même des mono et polyesters du Gr3.

. Les proportions en monoesters lipides des groupes 2 et 3 ne changent pas par rapport à celles des témoins:il est de même pour les polyesters sulfates et phohphates qu'elle que soit l'espèce considérée.

2° - Cas des eclairages artificiels de 1,4 1mpère/220 volts(P=300w)

Pelvetia caniculata

Pour cette algue les variations des teneur et composition des lipides polaires sont les suivantes:

1) Insaturation potentielle des acides gras constitutifs surtout ceux des Ag des lipides chloroplastiques. Le rapport AGS/AGIS des lipides polaires totaux est évalué à 0,32 contre 0,39 chez les témoins.

2) Augmentation en lipides polaires totaux de 2-4 % par rapport aux lots témoins.

3) Augmentation en lipides phosphores totaux de 4 % environ. Les valeurs des lipides soufrés totaux subissent au contraire une baisse de 1-3 %. Le rapport des proportions des LPh_T/LS_T est de 0,62 contre 0,58 pour les

témoins. Le rapport des lipides polaires du groupe 2/lipides polaires du groupe 3 est 0,443,celui des lots témoins est 0,44.

4) les proportions en polyesters sulfates et phosphates ne sont pas modifiées seules leurs teneurs baissent mais très faiblement par rapport aux témoins. Il en est de même des monoesters sulfates et phosphates.

Fucus vesiculosus

Pour Fucus vesiculosus les variations des teneur et composition en lipides polaires se manifestent en premier par une tendance à l'insaturation potentielle des acides gras constitutifs et tout particulièrement ceux des lipides chloroplastiques. Le rapport: AGS/AGIS est évalué à 0,34 contre 0,36 chez les témoins. Les lipides phosphorés totaux accusent une augmentation de 4-5 % par rapport aux témoins. Les lipides soufrés totaux , au contraire, subissent une baisse de 2 à 3 % et ce après 10 à 12 jours de culture expérimentale. Le rapport: LPh_T/LS_T est de 1,20 contre 1,02 chez les témoins. Au niveau des groupes nous avons noté une augmentation de 6-7 % des lipides du groupe de 0,5-1 % environ pour ceux du groupe 2. Les lipides polaires du groupe 3 au contraire baissent de 3-3,5 % par rapport aux témoins. Le rapport: lipides polaires du groupe 2/lipides polaires du groupe 3 est de 0,805 contre 0,80 chez les témoins. Pour les monoesters sulfates et phosphates les proportions n'ont pas varié bien que leurs taux aient faiblement baissé et il en est de même pour polyesters sulfates et phosphates lipides.

Fucus serratus

Ici teneur et composition en liquide polaires ont très peu varié . Ces lipides polaires ont les caracteristiques des lipides des deux autres algues. Nous avons note, comme pour les deux autres espéces, une insaturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires totaux et de ceux chloroplastes, une augmentation quantitative des lipides phosphorés du groupe 1 et 2. Les teneurs en lipides polaires du groupe 3 diminuent de 1-2 % par rapport à celles des temoins. Une variation faible des taux en monoesters et en polyesters sulfates et phosphates lipidiques quoique leur rapport reste inchangé.

Conclusions

Les variations quantitatives de l'intensité lumineuse se répercutent effectivement sur les teneur et composition en lipides polaires des trois algues. Quelle que soit l'espèce, les variations s'observent en premier au niveau de la saturation ou de l'insaturation potentielle des acides gras de ces lipides, et plus particulièrement sur les lipides polaires chloroplastiques. Les lumières intenses favorisent la saturation potentielle, par contre les lumières peu intenses accusent la tendance à une insaturation souvent très marquée. En second lieu, il y a tendance à une augmentation du taux en lipides polaires typiques dans le cas des lumières de faible intensité. Dans le cas où les lumières sont intenses, la tendance à une baisse du taux en lipides polaires totaux parait être de règle.

Les teneur et composition en lipides phosphorés totaux, pour les trois algues marquent une augmentation dans le cas de cultures sous lumières peu intenses. Mais en présence de lumières très intenses les lipides soufrés totaux augmentent quantitativement, les lipides phosphorés totaux ont subi à contre coup des baisses souvent importantes en particulier des lipides polaires des groupes 2. C aux du groupe 1 aussi mais de valeur plus faible dans la plupart des cas. Les rapports: monoesters sulfates et phosphates polyesters sont restées équivalents dans ces expériences.

5°) LUMIERES FILTREES

1) Variations qualitatives des lumières

Les lumières filtrées utilisées ont été obtenues au moyen de filtres WRATTEN KODAK n°64-47-22. Les lumières sélectionnees sont les suivantes:

1er Cas: 275-400 nm (64)

2eme Cas: 370-520 nm (47)

3 eme Cas: 420-650 nm (22)

Les algues cultivées dans des bacs de 50 cm de profondeur, leur aération et oxygénation permanente sont assurées par le dégagement continu sous l'eau, d'un courant d'air comprimé à débit constant. L'eau de mer qui alimente les bacs est constamment renouvelée par un système à circuit ouvert. Les évacuations sont assurées par des siphons nivelables automatiquement. Les cultures sont en outre soumises periodiquement à émersion suivant les rythmes des marées quotidiennes. Elles sont exposees à des éclairages intenses pendant ces émersions, à l'air libre, et par l'intermé-

diaire de deux lampes FLOODS placées latéralement, s'ajoutant au système d'eclairage artificiel continue. Les filtres sont places, en écran, à 5 cm, devant les sources lumineuses.

1) - Experiences avec les lumières de 275-400 nm

Les résultats obtenus au cours de cette étude (tableau XII), montrent que ce système d'éclairage est diversement accepté par les trois espèces et les interférences sur les composition et teneur en lipides polaires sont les suivantes:

Pelvetia canaliculata

Les Pelvetia canaliculata supportent mal ce sytème d'éclairage, les cultures manifestent les signes "d'essouflement" caractéristiques: les thalles flasques, de couleur jaune orange, la plupart meurent rapidement en huit à dix jours. Les survivants en petit nombre, sont apparemment peu robustes, Pour les algues provenant des cultures (4ème au 7 ème jours) les analyses de lipides polaires montrent des anomalies multiples.
Ces lipides polaires totaux diminuent de 2-3 %. Les teneurs en lipides soufrés totaux baissent de 4-5 %, mais celles des lipides phosphores totaux augmentent rapidement jusqu'au 5 ème jour de culture, puis se maintiennent à 6 % au dessus de la normale, et ce jusqu'à la mort des cultures. Les lipides du premier groupe ont tres peu varié à l'exception des X_5 qui ont augmenté de 2 à 3 % au départ, diminuent à nouveau atteignant 1 valeur de 6-7 % au dessous de la normale et elles s'y maintiennent jusqu'à la veille de la mort des thalles. Les valeurs X_9 augmentent à partir du cinquième jour, atteignant 4 % au dessus de la normale.
Les quantites du groupe 3 diminuent dans l'ensemble, faiblement au début puis tres rapidement vers le dixième jour de l'expérience; et à la veille de la mort des thalles il n'en reste plus que 76 % de la quantité initiale. Pour X_{12}, X_{11}, X_{11}, leurs poids diminuent dès les 5 premiers jours de l'expérience, ceux des X_{13}, et X_{14} augmentent parallèlement de 2-3 % et s'y maintiennent jusqu'à la veille de la mort des thalles.
Les lipides de la série 1 augmentent des les premiers jours de l'expérience et leur taux reste pendant la durée de l'expérience à 4 % environ au dessus de la normale.

Les acides gras constitutifs tendent vers vers l'insaturation.

Outre ces caractéristiques principales ajoutons que le poids des chloroplastes séparés est beaucoup plus faible que celui des témoins, et l'examen au microscope électronique montre une faible proportion des grana par rapport à ceux des cloroplastes des témoins. Par ailleurs la teneur en sulfates polysaccharidiques des parois a diminué de 20-25 % vers le 8 ème jour de l'expérience, or nous n'avons constaté aucune signe d'hémorragie caractéristique des sulfates, la turgescence des thalles est faible, mais il n'y a aucune perte d'eau anormale même à la veille de la mort des thalles.

Fucus vesiculosus

Sur Fucus vesiculosus les effets nocifs de ce système de lumière sont moins apparents durant les premiers jours de l'expérience, mais ils deviennent faiblement turgescents à partir du cinquième jour, tout en gardant leur couleur normale. Au bout de dix jours de culture un grand nombre d'individu meurent, les survivants, sont plus ou moins frêles, et leur développement est anormal.

L'analyse des lipides polaires entre le 3 ème et 10 ème jour d'expérience montre une diminution de 6-8 % de la teneur en lipides polaires totaux. Les valeurs des lipides phosphorés ont augmenté de 2-3 %, celles de X_2,X_3,X_4,X_5, ont augmenté de 2 %, les X_9, représentés par 2 % environ, ce qui est assez anormal, car des lipides ne sont pas présents normalement chez Fucus vesiculosus. Les X_6,X_7,X_8, n'ont pas varié significativement mais leur teneur tend à baisser faiblement par rapport a la normale. Les lipides du genre 3 ont diminué de 5-6 % et parmi eux les X_{12},X_{11},X_{11}, subissent une diminution de 8 % les X_{13} et les X_{14} ont au contraire augmenté de 2 % environ. Les lipides de la série 1 ont augmenté anormalement de 3-4 % mais leur variation est difficilement interprétable.

Les acides gras constitutifs tendent vers une insaturation très nette pour l'ensemble des lipides polaires.

. - Fucus serratus

Les Fucus serratus sont parmi les trois algues celles qui supportent le mieux les lumières à 275-400 nm. Les incommodations sont faiblement ressenties chez cette espece: durant la durée de l'expérience la culture se comporte normalement et le pourcentage de

thalles survivants est élevé.

L'analyse des lipides polaires montre une perturbation relativement faible: ils sont seulement moins abondants. Les phospholipides totaux sont à un taux de 1-2 % plus faible que chez les témoins, les teneurs en sulfolipides totaux diminuent, cette diminution est de l'ordre de 4-6 % au dessous de la normale.

Les valeurs du premier groupe augmentent de 2-4 % et parmi eux celles des X_3 et X_4 gagnent 2 %; les autres lipides de ce groupe ont peu varié, quantitativement.

Les teneurs en lipides du groupe 2 ont en général diminuent de 2-3 % comparativement aux témoins, celles de X_9 augmentent de 3 %, les X_6, X_7, X_8, ont tous subit des baisses de 1-2 % de leur teneur.

Les lipides du groupe 3 ont une diminution globale, les X_{13}, X_{14}; une augmentation faible de 1-1,5 % les X_{12}, $X_{11}, X_{11'}$: diminution de 2 à 3 %.

Les acides gras ont une faible tendance à l'insaturation potentielle marquée seulement pour les lipides de la série 1. Ceux-ci ont augmenté de 2-3 % dès les premiers jours de l'expérience.

Conclusion

Les lumières à 275-400 nm sont donc nocives aux trois algues, mais leurs effets sont plus ou moins accentués selon l'espèce, les Fucus serratus, sont des trois algues celles qui supportent le mieux cet éclairage; les Pelvetia canaliculata, au contraire le tolèrent difficilement, de même les Fucus vesiculosus. Pour les lipides polaires, les variations sont plus importantes chez Pelvetia canaliculata et Fucus vesiculosus; chez Fucus serratus nous n'avons constaté que des variations superficielles, de faible amplitude, de leurs LPT.

En résumé les variations des composition et teneur en lipides polaires des trois espèces choisies peuvent se résumer de la façon suivante:

- Insaturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires.
- Tendance générale à une diminution pondérale en lipides totaux
- Augmentation des poids en lipides du groupe 1 en polyesters phosphates et polysulfates mais ceux-ci à un

degré moindre.

. Diminution pondérale en polyesters phosphates et sulfates.

2) Effets des lumières à 370-520 nm.

Les lumières à 370-520 nm sont bien tolérées par les trois espèces. Les pourcentages des survivants sont plus élevés, les effets nocifs sont toutefois différemment ressentis selon l'espèce considérée.

Pelvetia canaliculata s'adapte facilement à ces conditions d'expérience. Durant les trois premiers jours de l'étude les thalles sont apparemment plus ou moins incommodés, mais vers le sixième jour il n'y a plus aucune trace de ces inconforts physiologiques.

L'analyse des lipides polaires totaux montre une diminution d'environ 3 % par rapport à la teneur normale. Celles des lipides phosphorés totaux diminuent de 3-4 %, X_2, X_3, X_5, augmentent de 4-5 %; pour les lipides du deuxième groupe: baisses de 1-2 %. Les valeurs en lipides soufrés totaux augmentent de 2-3 % environ par rapport à celles des témoins. Celles de X_{12}, X_{11}, X_{11}, augmentent de 2-4 %, les X_{13} et X_{14} accusent une diminution de 2 % et 6 % respectivement. Les poids des lipides de la série 1 augmentent de 2-3 % par rapport à ceux des témoins.

Les acides gras constitutifs des divers lipides polaires tendent vers une saturation potentielle assez nette surtout ceux des monesters sulfates.

Nous n'avons pas observé l'hémorragie des sulfates polysaccharides des parois bien qu'une baisse de 10-12 % ait été calculée entre les 18-25 eme jours de culture expérimentale.

Fucus vesiculosus

Ici les variations des teneur et composition en lipides polaires totaux sont assez comparables à celles déjà observées pour Pelvetia canaliculata. Les périodes d'incommodation physiologiques sont d'assez courtes durées, elle varient entre les 4 ème et 6 ème jours. Durant cette adaptation les poids en lipides polaires totaux diminuent de 2-3 %, mais dès que les algues s'habituent à la lumière dispensée, leurs poids en lipides polaires totaux sont plus constants, soit de 3 % au dessous de la valeur des témoins.

Les lipides phosphorés totaux ont subi une diminution de 3-4 % et parmi eux les X_3,X_4,X_5, augmentent des 2-2,5 %, les teneurs EN lipides du groupe 2 diminuent toutes de 1-2 %. Les poids des lipides soufrés totaux augmentent d'environ 3 à 4 %. Ceux de X_{12}, X_{13},X_{13},X_{14}, sont en hausse de 2-4 % ; pour les autres sulfolipides ils diminuent globalement de 1-2 % Les acides gras constitutifs tendent vers une saturation potentielle. Les sulfates esters des polysaccharides des parois diminuent en poids de 15 à 20 % entre les 20 ème et 30 ème jours de l'expérience mais comme pour Pelvetia canaliculata, aucune hémorragie importante n'a été constatée. Les thalles n'ont pas subit semble-t-il, des pertes d'eau intracellulaire , même vers la fin de l'expérience.

Fucus serratus

Ici la lumière à 370-520 nm, est beaucoup plus mal tolérée que par les deux algues précédentes. Cependant les dégâts, causés aux thalles, sont très limités en apparence. Les taux des lipides polaires totaux diminuent de 3-4 % ceux des lipides phosphorés totaux de 3 % pour X_3,X_4, ils augmentent de 3-4 %; les X_2,X_5 et l'ensemble des lipides du groupe 2 ont diminué de 1-2 % par rapport aux teneurs initiales.

Les lipides soufrés totaux tendent à augmenter dans l'ensemble, X_{13}, et X_{14} augmentent aussi de 4 % et 6 % respectivement, X_{12},X_{11},X_{11}, diminuent de 2-3 % environ.

Les lipides de la 1ère serie augmentent en général et au cours de l'expérience montrent une fluctuation de 3 à 5 % au dessus de la valeur trouvée normalement chez les témoins.

Les acides gras constitutifs marquent une tendance à la saturation potentielle très nette, surtout pour les acides gras des monoesters sulfatés et phosphates.

Les sulfates polysaccharidiques subissent une baisse de 8-10 % entre les 26 ème et 35 ème jours de l'expérience mais les thalles ne paraissent pas en souffrir. Aucune perte sensible d'eau intracellulaire ni d'"hémorragie" en sulfates polysaccharidiques n'ont été constatées même à la fin de l'expérience.

En résumé

Les lumières à 370-520 nm sont semble-t-il assez bien tolérées par les trois espèces d'algues. Les incommodations paraissent superficielles et de courtes durees. Les variations des teneur et

composition en lipides polaires sont du type suivant pour l'ensemble des trois espèces:

- Saturation potentielle des acides gras constitutifs des divers lipides polaires
- Diminution en lipides polaires totaux
- Augmentation de la teneur en sulfolipides et diminution de celle des lipides phosphorés totaux
- Tendance nette à l'augmentation en monoesters sulfates et phosphates et parallèlement diminution en polyesters sulfates et phosphates.

3) - Effet des lumieres à 400-650 nm.

Les lumières à 400-650 nm sont généralement acceptées sans difficulté majeure par les Pelvetia canaliculata et Fucus vesiculosus. Les Fucus serratus au contraire s'adaptent assez mal et les pourcentages de survivants sont relativement faibles.

Pelvetia canaliculata

Chez les Pelvetia canaliculata les signes extérieurs d'inconfort physiologiques dus à cette catégorie de lumières employées sont manifestes: les thalles sont restés bien turgescents pendant toute la durée de l'expérience, leur couleur est aussi la même que chez les thalles normaux. Concernant les teneur et composition en lipides polaires les résultats analytiques montrent une diminution de 4-5 % par rapport aux témoins, des lipides polaires totaux. Les lipides phosphorés totaux ont diminué de 6-7 % et parmi eux les X_6,X_7,X_8, ont augmenté de 2 %; les autres lipides ont accusé une baisse de 2-3 % dans leur ensemble. Les lipides soufrés totaux ont augmenté dans l'ensemble de 5-6 % et parmi eux les X_{13}, et les X_{14}, ont diminué de 3-4 %; les X_{12},X_{11},X_{11}, ont augmenté de 3 % par rapport à leur taux initial.

Les lipides de la série 1 ont augmenté en général de 3-4 % [illegible] mais leur variation est souvent difficile à interpreter. Concernant les acides gras constitutifs une tendance nette à la saturation potentielle a été enregistrée, notamment pour les acides gras des monoesters sulfates et phosphates.

Les teneurs en sulfates polysaccharidiques des parois ont diminué de 4 à 5 % par rapport à la normale, et les thalles n'ont

à aucun moment souffert d'hémorragies de sulfates ni de pertes d'eau intracellulaire.

Fucus vesiculosus

Les Fucus vesiculosus sont comme les Pelvetia canaliculata aptes à supporter les lumières à 460-650 nm. Les lipides polaires ont néanmoins subi quelques variations quant à leur taux et composition. Les lipides polaires totaux ont diminué de 4 % environ, les phospholipides totaux ont tendance à diminuer et une baisse de 3 % a été enregistrée au cours de cette expérience. Les lipides soufrés totaux ont augmenté de 2-3 % mais de façon irrégulière. Les lipides du premier groupe ont augmenté de 1 % comparativement aux témoins; les X_2,X_3, sont en général en augmentation quant à leur taux; les X_6,X_8, aussi ont connu une certaine augmentation; les autres lipides du groupe 1 et du groupe 2 sont en légère baisse. Les X_{13},X_{14}, ont aussi diminué de 2 %; les X_{12},X_{11},X_{11}, ont tous augmenté de 3 % en moyenne. Les lipides de la première série ont augmenté de 3 % au cours de cette expérience surtout entre les 4 ème et 8 ème joursde culture. Concernant les acides gras constitutifs des divers lipides polaires la tendance générale à la saturation potentielle est très nette. Les sulfates polysaccharidiques ont subi une perte de 6 % de leur taux initial, mais aucune hémorragie des sulfates n'a été constatée, de même pour la perte d'eau intracellulaire.

Fucus serratus

Ces algues supportent assez mal les lumières à 400-650 nm et leurs effets nocifs sont manifestes. Durant les cinq premiers jours de l'expérience le nombre de thalles est relativement élevé, les autres s'adaptent plus ou moins bien . Un tiers du lot parait définitivement adapté dès le 10 ème jour. L'analyse des lipides polaires totaux des thalles entre les 6 ème et le 20 ème jours montrent une diminution de 4 à 6 % en poids. Ceux des lipides phosphorés totaux baissent de 5 %. Parmi les lipides polaires phosphorés, ceux du groupe I augmentent globalement de 2 %, ceux du groupe 2 diminuent . La teneur en X_9 au contraire augmente de 2 % comparativement aux témoins. Les lipides du groupe 3 sont en hausse de 1 % à l'exception des X_{13} et X_{14} qui perdent 3 % du taux initial.

Les acides gras constitutifs tendent vers une saturation potentielle très nette. Les taux en sulfates polysaccharidiques baissent de 16 %, mais aucune hémorragie n'a été constatée.

En résumé

Les lumières à 400-650 nm sont bien supportees par P.canaliculata et Fucus vesiculosus, Fucus serratus au contraire les acceptent mal. Les teneur et composition en lipides polaires, les variations peuvent être résumées ainsi:

- Tendance générale à la saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires totaux, et surtout ceux des chloroplastes.
- Baisse des teneurs en liPuides polaires totaux.
- Augmentation en lipides soufrés totaux et diminution en lipides phosphorés totaux.
- Tendance à la baisse des teneurs en polyesters sulfates et phosphates, celles en monoesters sulfates tendent à augmenter, celles en monoesters phosphates ne varient pas de façon significative.

2a - Cas de lumières filtrées à intensités variables

En faisant varier les intensités des lumières filtrées nous avons constaté que quelle que soit l'espece et l'eclairagee dispense, la chance de survie des thalles est faible: toutes les cultures meurent vers les 20 ème/25 ème jours de l'expérieence. L'analyse des lipides polaires totaux montre une augmentation désordonnée de tous ces lipides, sauf ceux des chloroplastes qui gardent les profils acquis par un éclairage donne . On constate une tendance à l'accroissement pondéral en lipides polaires totaux. Mais au niveau des groupes ce sont géneralement ceux du groupe I qui ont le plus augmente quantitativement. Les lipides du groupe 2 diminuent, sauf ceux des chloroplastes. Ceux-ci varient peu sous les différentes intensités des lumières expérimentees. Il en est de même des lipides du groupe 3 parmi lesquels X_{14} et X_{15} s'accroissement notablement, les teneurs des autres lipides de ce groupe ne varient pascomparativement aux témoins soumis au même système d'éclairage (400 Watts.)

les

Conclusion

L'étude des effets des lumières filtrées des trois types d'éclairage mentionnes ci-dessus, montre que les algues de surface tolèrent plus facilement les lumières de longueurs d'onde comprises entre 370-520 nm et 400-650 nm. Par contre les lumières riches en courtes longueur d'onde sont assez nocives pour ces deux espèces. Pour Fucus serratus l'inverse est observé: cette espèce tolère mieux les lumières comprises entre 275-400 nm, les autres lumières leur sont plus ou moins nocives. La teneur en lipides polaires des thalles exposés aux lumières à 275-4000 nm baisse, et chez les trois espèces , les poids en lipides phosphorés totaux augmentent eux dans la plupart des cas , ceux des lipides soufrés au contrire diminuent. Le trait le plus caractéristique reste la baisse des taux en monoesters sulfates et phosphates des trois algues si celles-ci sont cultivées sous lumières de longueurs d'onde comprises entre 275-400 nm. Les poids en polyesters sulfates et phosphates augmentent parallèlement. Les acides gras constitutifs des lipides polaires sont plus insaturés que normalement. Tous ces faits se rapprochent des variations en lipides polaires des 3 espèces au cours des mauvaises saisons: le profil des teneur et composition en lipides polaires devient ainsi comparable à ceux des lots d'automne et d'hiver de ces 3 algues.

Les lumières à 370-520 nm et 420-650 nm produisent des effets opposés sur les variations des teneur et composition en lipides polairs des 3 espèces. Elles provoquent: la saturation potentielle des acides gras des lipides polaires des 3 algues etudiées, l'augmentation des sulfolipides totaux et la diminution parallèle des phospholipides totaux. Les taux des monoesters sulfates et phosphates augmentent, ceux des polyesters sulfates et phosphates parallèlement s'abaissent . Dans l'ensemble, le profil des lipides polaires des 3 algues étudiées est comparable à celui des lots de printemps et d'eté, quelle que soit l'espèce considérée. De plus les "hémorragies" en sulfates polysaccharidiques n'ont pas été observées chez aucune des 3 algues au cours de ces expériences, et quelles soient les lumières sélectionnées. Les resultats obtenus confirment par ailleurs l'hypothèse suivante: les monoesters sulfates et phosphates sont des lipides fonctionnels à l'égard des lumières de courtes longueurs d'onde tandis que les polyesters

sulfates et phosphates le seraient vis à vis des lumières de grandes longueurs d'onde. En outre les lipides phosphores une fois de plus sont les lipides predominants sous les lumières quantitativement peu intenses: les lipides soufrés prédomineraient dans les cas de culture sous lumières de grandes longueursd'onde .

Si les variations quantitatives des lumières n'influencent pas les proportions respectives en mono et polyesters sulfates et phosphates des 3 algues, quoique leurs taux en lipides augmentent ou diminuent selon les cas, les variations qualitatives des lumières, provoquent elles, des modifications notables de ces proportions. On peut constater même un déséquilible total des valeurs lipides Gr2/lipides Gr3 conduisant à la désorganisation structurale des chloroplastes si les temps d'expériences sont top longs. Dans ces conditions les adaptations sont souvent impossibles, car un certain seuil parait dépassé.

En résumé

- Lumières à 275-400 nm..... Insaturation potentielle des acides gras
  .Augmentation de la teneur en lipides polaires totaux
  .Augmentation de teneur en lipides phosphores totaux et diminution parallèle en lipides soufrés totaux
  .Teneurs en polyesters sulfates et phosphates plus élevés que celles en monoesters sulfates et phosphates
- Lumières à 370-520 nm..... Saturation potentielle des acides gras
  .Diminution de la teneur en lipides polaires totaux
  .Diminution des teneurs en lipides phosphorés totaux et augmentation parallèle de celles des lipides soufrés totaux
  .Augmentation de la teneur en monoesters sulfates et phosphates
- Lumières à 120-650 nm ..... Saturation potentielle des acides gras
  .Diminution de la teneur en lipides polaires totaux

.Diminution en lipides phosphorés totaux et augmentation parallèle en lipides soufrés totaux

.Augmentation de la teneur en monoesters sulfates et phosphates et diminution en polyesters sulfates et phosphates

Pas de perte en sulfates polysaccharidiques non lipidiques

6°) - Cultures expérimentales en immersion permanente

Cette étude doit mettre en évidence l'influence d'une immersion continue; sur la variation de ses composition et teneur en lipides polaires des trois espèces en démontrant le processus des modifications entrainées. Du point de vue physiologique, l'immersion continue est généralement très néfaste pour différentes espèces. Dans leur habitat naturel, deux des trois espèces choisies sont quotidiennement immergées de façon périodique, aux rythmes des marées. Les durées d'exposition à l'air libre dépendent des fréquences des marées et de l'habitat de l'espèce sur le littoral.
En culture expérimentale, nous avons déjà constaté que les algues de surface (P.c.) s'adaptent mal à ces conditions même pendant une courte durée. Les algues de profondeur supportent relativement mieux l'immersion continue à condition qu'elles ne dépasse pas une certaine durée tolérée par l'algue.

A- Pelvetia canaliculata, supportent très mal ces conditions et ne peuvent leur survivre au delà de dix jours. Pendant les trois premiers jours les cultures gardent un aspect morphologique normal mais si on expose les thalles à l'air libre, une demi-heure plus tard ils perdent irrémédiablement leur turgescence, même replacés dans l'eau ils continuent à dépérir, ce qui ne s'observe pas avec les thalles cultivés normalement. La perte de la capacité a réabserber l'eau est difficilement expliquable. Les teneurs en sulfates polysaccharidiques des parois étant restées normales, et les thalles n'ayant apparemment manifeste aucun signe caractéristique de lésion ou traumatisme. Il n'est pas impossible que les causes soient plus profondes: l'hypothèse d'une perte enzymatique n'est pas à ecarter.

Après une semaine de culture les thalles deviennent flasques, et ils meurent rapidement en huit à dix jours. L'analyse des lipides polaires montre une augmentation de 3-4 % pendant les 3 premiers jours, les teneurs en lipides phosphorés totaux augmentent

ence. Les effets nocifs de l'immersion continue sur les variations des teneur et composition en lipides polaires, sont comparables chez Fucus vesiculosus et Pelvetia canaliculata. Des troubles métaboliques profonds apparaissent aussi chez Fucus vesiculosus ,qui très sensiblement diminuent les capacités de résistance des algues, rendant le processus d'adaptation impossible, et irréversible dès le troisième jour de l'expérience.

C - Fucus serratus, les incommodations sont manifestes à partir du sixème jour elles peuvent se prolonger pendant trois ou quatre jours, mais l'immersion totale et permanente n'est jamais fatale pour cette espèce. L'adaptation est difficile certes, et la survie peut être considérée comme définitive après le sixième jour de culture pour les thalles adaptés. L'analyse des lipides polaires totaux entre les 3ème et 15 ème jours de l'expérience montre une réorganisation très nette de l'équipement lipidique de cette espèce. Les valeurs des lipides polaires totaux décroissent de1-2 % entre le 10 ème et le 15 ème jours de culture. Cette teneur augmentait d'abord de 3-4 % durant les cinq premiers jours de culture, puis de 6-7 % au huitième jour, diminuant ensuite, pour atteindre un taux de 2 % en dessous de la valeur normale vers le 10 ème jour de culture. Les teneurs en phospholipides totaux diminuent de 2-3 % pendant les premiers jours ensuite augmentent de 6-7% au 8 ème jour. A partir du dixième jour et jusqu'à la fin de l'expérience la teneur en phospholipides totaux est maintenue à 3 % au dessus de la valeur normale. Les lipides de la première série ont augmenté de 3-4 %. Les lipides du groupe 1 ont augmenté de 2 % . Parmi eux les X_3,et les X_4, ont augmenté de 2 %; les X_2,X_5, n'ont pas varié. Les lipides du groupe 2 ont augmenté de 1-2 %, les X_9, marquent une augmentation de 4 %; les autres lipides du groupe 2 ont diminué de 1-2 % environ dans leur ensemble.

Les lipides polaires du groupe 3 ont diminué de 2 % dans leur ensemble, les X_{13},X_{14}, ont augmenté de 3 % en moyenne; les taux de X_{12},X_{11},X_{11}, ont au contraire subi des diminutions d'environ 4 % par rapport à leur valeurs témoins.

Les acides gras des divers lipides polaires, tendent à l'insaturation potentielle très nette. L'hémorragie en sulfates polysaccharidiques des parois est enregistrée vers le 16 ème jour de culture, mais la mort de la culture ne suvient que bien plus tard.

Conclusions

Il résulte de cette étude qu'une immersion totale et permanente est très nocive pour nos trois algues. En outre l'incidence sur les teneur et composition en lipides polaires sont manifestes. Elle se fait à trois niveaux, globalement les varaitions dues à l'immersion permanente sont comparables aux variations provoquées par l'action de l'obscurité totale et permanente. Les variations des teneur et composition en lipides polaires des algues totalement immergées peuvent se résumer de la façon suivante:

- Insaturation potentielle des acides gras
- Diminution en lipides polaires totaux
- Tendance à l'augmentation en lipides phosphorés totaux et diminution en lipides soufrés totaux d'où rupture de l'équilibre des rapports LPh_T/LS_T
- Augmentation de la teneur en polyesters sulfates et phosphates et diminution parallèle en monoesters sulfates et phosphates, entraînant à la longue, la rupture de l'équilibre des rapports des lipides du Gr 2/lipides Gr3 et la désorganisation structurale des chloroplastes.
- Hémorragie des sulfates polysaccharidiques des parois

Outre ces effets il faut ajouter encore le trouble métabolique profond dès les premiers jours de l'expérience et cela quelque soit l'espèce considérée. Ce trouble se manifeste par la perte de la capacité de retention d'eau intracellulaire avant même que l'hémorragie des sulfates polysaccharidiques ne se manifeste . Enfin les lipides de la série 1, qui ont aussi été profondement remaniés de ce fait accusent, entre autres, l'activité intense du métabolisme dès les premiers jours de l'experience.

7) - Cultures émergées en permanence

Une culture complètement émergée et de façon permanente provoque des effets diversement nocifs chez les trois algues etudiées. - Chez Pelvetia canaliculata, nous avons observé une certaine tolérance, et après une période relativement courte d'inconfort physiologique la proportion des survivants reste relativement élevée . Toutefois si l'émersion est trop longue la mort de la culture survient : ? Durant les cinq premiers jours de l'expérience, les thalles sont rabougris, perdant leur turgescence et leur couleur s'éclaircit visiblement. L'analyse des lipides polaires, entre les 3 ème et 20 ème jours de culture, souligne une augmentation sensible

de : 3-4 % durant les 6 premiers jours, puis à partir du 8 ème jour une baisse s'amorce et s'installe progressivement pour se stabiliser à environ 3 % au dessus de la valeur initiale ceci jusqu'à la mort de la culture. Les valeurs des lipides phosphorés totaux diminuent dans l'ensemble de 4-5 % , celles des X_4,X_5, augmentent de 1-3 %, elles n'ont pas varié pour X_2 et X_3. Celles de X_9, diminuent de 5 %, tandis que celles des X_6,X_7,X_8, s'accroissent de 3 % environ, par rapport aux valeurs initiales. Leslipides soufrés totaux ont subi une augmentation de 3-4 % , entre les 3 ème et 10 ème jours de culture, puis une diminution progressive s'établit vers le 12 ème jour atteignant de 2 % au dessus de la teneur normale, entre le 15 ème et le 25 ème jour de culture. Les valeurs de X_{12}, X_{11},X_{11}, augmentent de 4-6 % au début mais jusqu'à la fin de l'expérience elles se maintiennent à 2 % audessus de la valeur initiale. Pour X_{13} et X_{14}, au contraire leurs valeurs diminuent régulièrement entre le 4 ème et 10 ème jours puis se fixent à 3 % au dessous d de la valeur primitive.

Les lipides de la première série gagnant tous 2 à 3 % surtout pendant les premiers jours de culture, ce qui caractérise une activité métabolique plus ou moins intense durant cette période. Les acides gras constitutifs tendent vers une insaturation potentielle surtout pour les acides gras des monoesters sulfates et phosphates.

Par ailleurs les sulfates polysaccharidiques subissent vers la fin de l'expérience une baisse de plus de 28 %,alors que l'hemorragie des sulfates s'observe vers le 25 ème jour de l'expérience, elle précède de très peu la mort de la culture.

- Chez Fucus vesiculosus, les incommodations dues à l'émmersion continue sont plus profonde que chez Pelvetia canaliculata, la proportion de survivants après 25 jours de culture est relativement faible; la plupart des thalles adaptés sont manifestement viables, du moins apparemment, ils peuvent survivre au delà d'une trentaine de jours.

L'analyse des lipides polaires montre un gain de 4-6 % durant les premiers jours, puis une baisse s'amorçant vers le 8 ème jour. Cetaux devient de 3 % supérieur à sa valeur normale au 10 ème jour. Jusqu'à la mort de la culture, survenant vers 30 jours d'expérience., la teneur acquise se tient . Les lipides phosphorés

main/

totaux subissent une diminution globale de 4 % entre le 3 ème et le 8 ème jour, puis de 5% jusqu'à la fin de l'expérience. Les X_3, X_4, X_5, gagnent de 5% au début puis leur taux se stabilise gagnent 3 % sur la valeur initiale. Les autres lipides du groupe 1 et 2 ne varient pas, sauf les X_8 qui augmentent entre les 6 ème et 20 ème jours de culture.

Les lipides soufrés totaux s'accroissent de 3 % en moyenne dès le 5 ème jour, leur taux se maintient alors pendant toute la durée de l'experience. Les X_{12}, X_{11}, X_{11}, gagnent 5 % les X_{13}, X_{14}, diminuent fortement et vers la fin de l'expérience en ne trouve plus que 75 % de leurs teneurs initiales .

Les lipides de la première série gagnent 4 % dès le 4 eme jour de l'expérience et se maintiennent à ce taux jusqu'à la mort de la culture.

Les acides gras constitutifs marquent une nette tendance à la saturation potentielle et ce dès le premier jour de l'expérience. Les teneurs en sulfates polysaccharidiques des parois subissent des baisses continuelles des le 6 ème jour de culture mais aucune hémorragie réelle n'apparait à la veille de la mort de la culture bien que cette teneur en sulfates polysaccharidiques soit très basse 24 heure avant la mort de la culture.

- Chez Fucus serratus , les effets nocifs de l'émersion continue sont très nets, la proportion de survivants après douze jours de culture est faible . Ceux qui ont franchi ce cap difficile sont restés apparemment rabougris, faiblement turgescents et de couleur souvent très terne. L'analyse de leurs lipides polaires montre une augmentation de 4 % entre les 3 ème et 8 ème jours de culture. Entre les 10 ème et 25 ème jours d'expérience en lipides autour de sa valeur de 3 % supérieure de la valeur normale.

Les teneurs en lipides phosphorés totaux diminuent de 4 % en moyenne entre les 4 ème et 8 ème jours, puis jusqu'à la fin de l'expérience restent constamment de 2 % environ, supérieures à leur valeur primitive. Les X_3, X_5, augmentent de 3 % celles de X_2, X_4, invariables pendant les 8 premiers jours de culture , elles diminuent rapidement pour atteindre 60 % de leur valeur primitive à la veille de la mort des thalles. Les valeurs X_6, X_7, X_8, augmentent de 1-3 % jusqu'au jour de culture puis tombent rapidement au dessous de la teneur initiale, de 15 % environ. Celles des X_9,

20ème/

de 8 % au 10 ème jour de l'expérience. Les lipides soufrés totaux subissent d'abord une augmentation de 6 % puis leur taux LST ensuite ramené à 2 % seulement entre les 15 et 25 ème jours de l'expérience. Les taux des X_{12}, X_{11}, X_{11}, augmentent de 4 % pendant la durée de l'expérience, ceux des X_{13}, X_{14}, au contraire diminuent de 3 % au début puis de 8-10 % vers le 25 ème jour de culture.

Les quantités de lipides de la première série augmentent de 4 % celles de X_{15} en particulier gagnent de 5 à 7 % entre les 8 ème et 16 ème jours de culture expérimentale.

Les acides gras de tous ces lipides tendent vers leur saturation, principalement entre les 6 ème et 10 ème jours de l'expérience. Une hemorragie abondante en sulfates polysaccharidiques débute vers le 15 ème jour, lente d'abord puis très abondante dès le 22 ème jour d'expérience.

Conclusions

Cette étude montre que l'émersion permanente est très nocive pour les trois algues. Toutefois Pelvetia canaliculata et Fucus vesiculosus la supportent mieux que Fucus serratus, celle -ci particulièrement sensible , des troubles métaboliques très profonds conduisent immanquablement à la mort des cultures .

Les incidences sur la varia tion des composition et teneur en lipide polaires sont par ailleurs très nombreuses, l'effet d'ensemble étant comparable à celui des éclairages continus antérieurement étudiés. En général quelle que soit l'espèce considérée nous avons constaté invariablement:

- Une tendance nette à la saturation potentielle des acides gras constitutifs des lipides polaires totaux et plus particulièrement de ceux monoesters sulfates et phosphates
- Augmentation de la teneur en lipides polaires totaux et diminution en lipides phosphorés totaux. les quantités de lipides soufrés totaux ont augmenté parallèlement, et enfin le rapport d'équilibre des LPhT/LST est détruit
- Augmentation des teneurs en monoesters sulfates et phosphates, celles des polyesters sulfates et phosphates tendant à diminuer quantativement, entrainant la désorganisation structurale des chloroplastes.

Discussion générale

Il en résulte que les divers facteurs (lumière, émersion et immersion permanente) ont des effets déterminant sur les teneur et composition en lipides polaires des trois algues. Ils conditionnent le développement biologique normal de ces différentes espèces. Les effets produits, sur les trois algues, variés, sont plus ou moins acceptés par chacune d'elles. Ils deviennent toxiques sinon nocifs au delà de certaines limites.

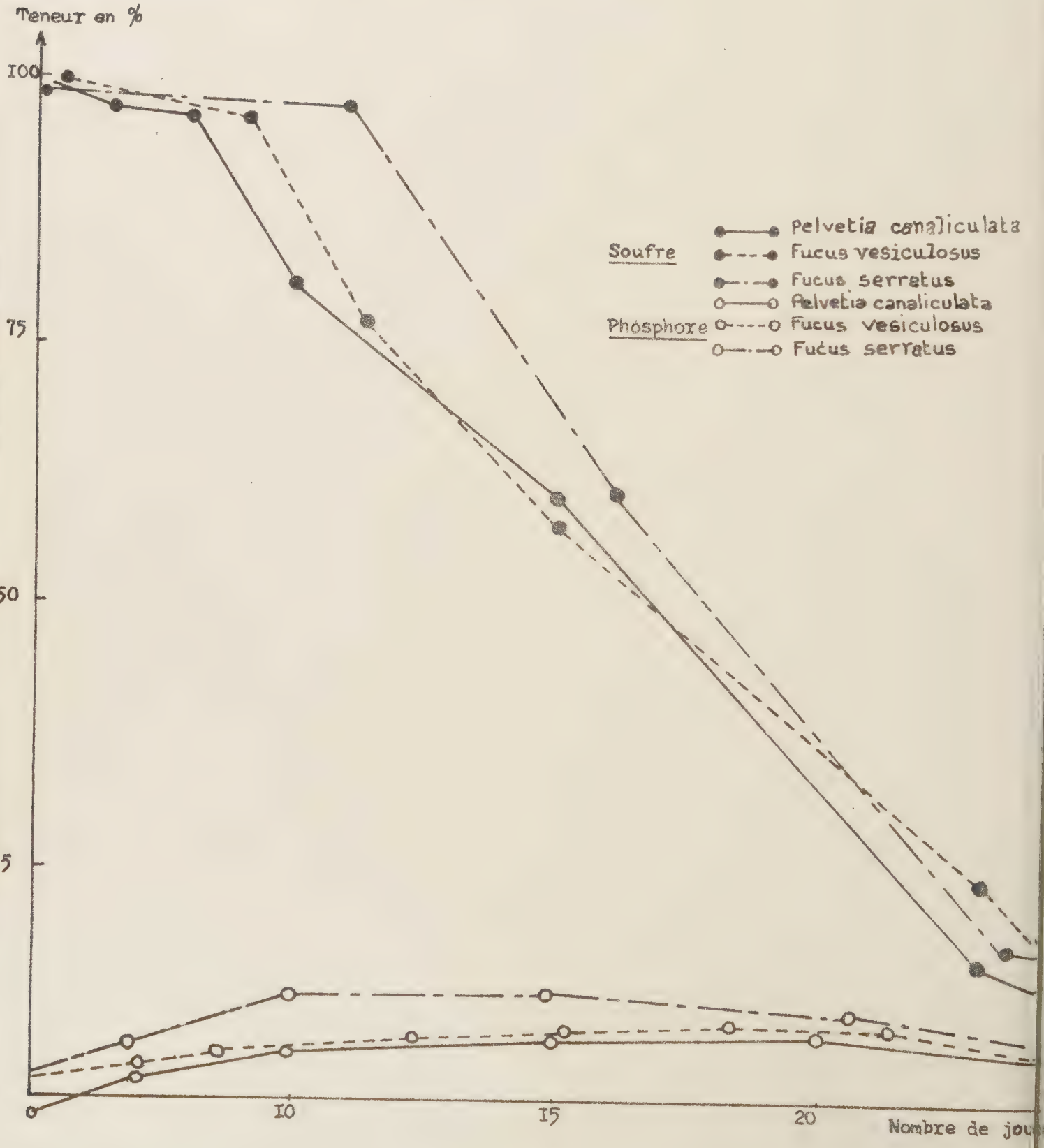
La lumière joue un rôle essentiel sur la vie de ces algues comme pour les autres végétaux. Chaque espèce, de par son habitat, reçoi quotidiennement une certaine quantité de lumière dont la nature et l'intensité varient sensiblement. Les équipements lipidiques de chaque espèce sont alors plus ou moins différents, en particulier les lipides de leurs appareils photosynthétiques. Les plastes ont en effet des composition et teneur en lipides polaires établies en relation avec la qualité et la quantité de lumière reçues quotidiennement. Les variations qualitative et quantitative de lumière provoquent aussi des modifications plus ou moins profondes de l'équipement en lipides polaires. Ces modifications peuvent entraîner des désorganisations graves dans la structure de certains organites cellulaires se manifestant à leur tour par des troubles métaboliques profonds, entraînant la mort de la cellule.

Les divers cycles circadiens dont les alternances rythmées (obscurité/lumière, immersion/émersion) caractérisentainsi chaque espèce ,suivant son habitat.
Le facteur lumière y est donc prépondérant. Les effets de nocivité, dûs à la lumière, et considérés ci-dessus séparément, sont donc plus ou moins ressentis: la tolérance variant d'une espèce à l'autre. Mais la notion de seuil s'impose, principalement lors de l'adaptation de l'edpèce à une intensité lumineuse donnée.

D'autre part, l'absence de ces rythmes circadiens a des interférences certaines sur la variation des teneur et composition en lipides polaires. Si leurs effets sont prolongés, la structure des divers organites se dégrade. Cette dégradation est une des conséquences des variations des teneur et composition en lipides polaires de l'équipement lipidique de chaque algue. Elle est précédée par la rupture de l'équilibre du rapport de proportion: phospholipides/sulfolipides totaux. Ce rapport est caractéristique de l'espèce; il est d'importance

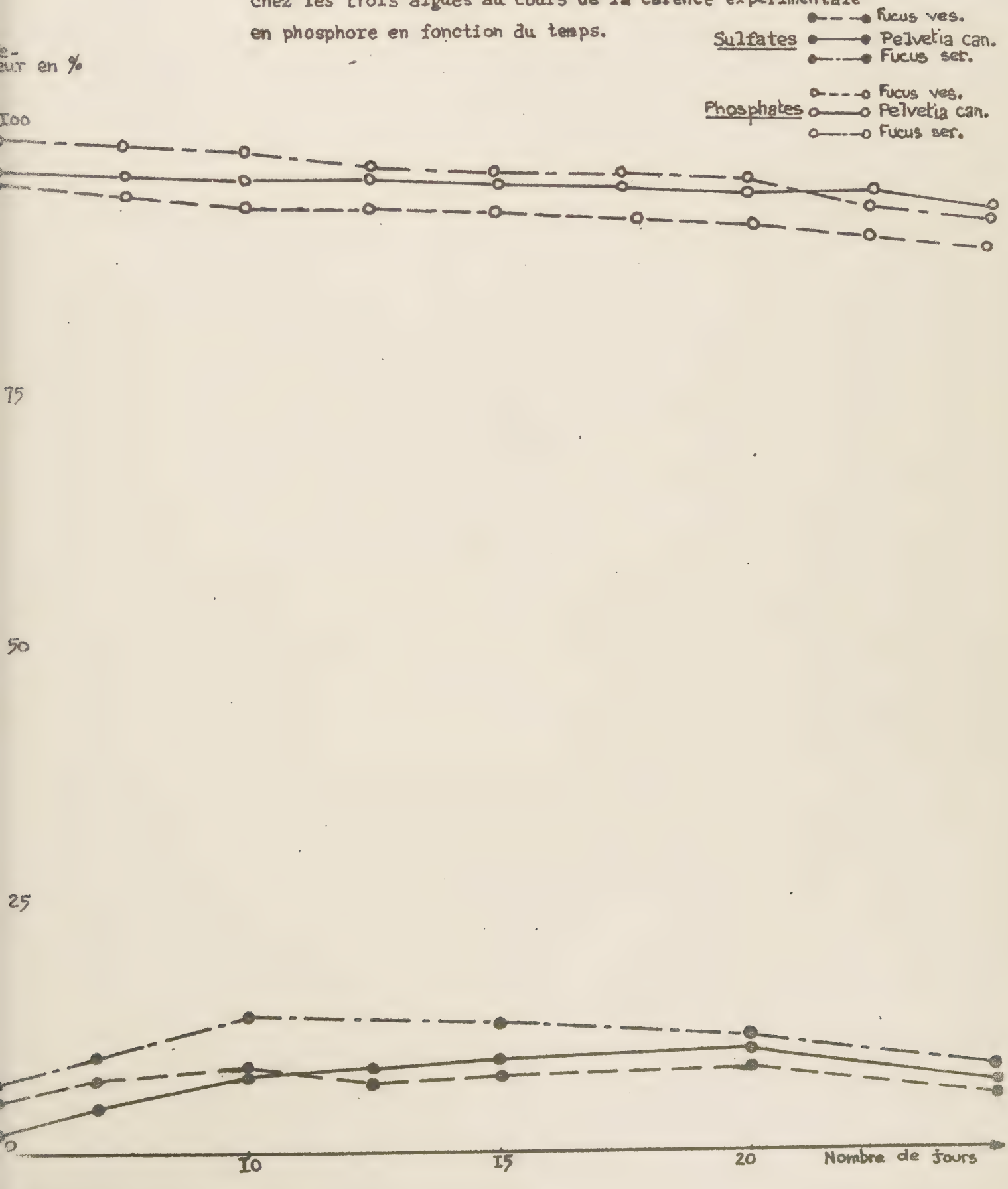
COURBE 4A

Variations des teneurs en sulfates et phosphates totaux chez les trois algues au cours de la carence en expérimentale en soufre et en fonction du temps.



COURBE 4 B

Variations des teneurs en sulfates et phosphates totaux chez les trois algues au cours de la carence expérimentale en phosphore en fonction du temps.



capitale dans la physiologie des thalles.

Comme nous l'avons constaté au cours des expériences précédentes, il existe donc chez chacune des trois espèces étudiées un rapport de proportion lipides phosphorés/lipides soufrés totaux d'une part et un deuxième rapport, non moins important, lipides du Gr 2/ lipides du Gr 3. Ce rapport est spécifique: il est facteur déterminant de la constitution de l'infrastructure des divers organites cellulaires principalement des chloroplastes formant en quelque sorte l'organe moteur de la vie cellulaire. La rupture d'équilibre du rapport: lipides soufrés/phosphorés totaux est mortelle pour les différentes espèces mais de façon diverse car la tolérance est différente suivant l'espèce considérée. Cependant, quelque soit ce niveau de tolérance, les troubles métaboliques dus aux variations des teneur et composition en lipides polaires et plus particulièrement aux ruptures de l'équilibre des proportions: lipides soufrés/lipides phosphorés totaux, entraînent indubitablement la mort des thalles au delà d'une certaine limite. Ces troubles sont à l'origine de la réduction de la capacité métabolique des thalles, conséquence directe de la désorganisation infrastructurale de certains organites cellulaires.

III. Effets des carences en soufre et en phosphore sur les teneur et composition en lipides polaires.

A). Carences en soufre:

Le soufre est un élément très réactif à plusieurs titres. En premier lieu par sa structure électronique, le soufre dispose de valences multiples entre +6 et -2 (S^{+6} - S^{-2}). En second lieu, dans des conditions déterminées, le passage de l'état oxydé à l'état réduit se fait facilement, ce qui, au niveau physiologique, confère aux sulfates des propriétés physico-chimiques particulières. De plus, sa possibilité d'intervention en tant que centre actif enzymatique, activateur ou inhibiteur de différents systèmes catalytiques souligne l'importance de cet élément présent dans toutes les matières vivantes animales et végétales Le soufre peut aussi être utilisé indifféremment par les organismes vivants selon que ces derniers sont autotrophes ou hétérotrophes. Les plantes vertes et beaucoup de microorganismes sont capables d'utiliser les sulfates minéraux pour la synthèse de leurs composés organiques. D'autres organismes inférieurs,dont les bactéries en général, ne peuvent utiliser le soufre que sous forme de sulfates organiques en les réduisant, par un mécanisme particulier, en substances sulfurylées ou sulfhydrylées

intermédiaires dont ils se servent comme métabolites essentiels (101-140).

Les différentes voies métaboliques, conduisant à la formation de divers composés soufrés organiques à partir du soufre minéral, restent encore obscures car elles sont incomplètement étudiées de nos jours.

Les seuls mécanismes assez bien connus sont ceux qui jalonnent les étapes de formation: (intermédiaires de réduction) des sulfates en sulfures et en sulfites, dégageant les rôles de pourvoyeurs électroniques que sont les molécules de sulfates organiques dans les diverses matières vivantes intermédiaires. Grâce au nombre croissant de travaux sur le soufre protidique, des progrès considérables ont été enregistrés dans le métabolisme du soufre. En ce qui concerne les soufres lipidique ou glucidique, nos connaissances sont restées fragmentaires quoique leur rôle chez les êtres vivants soient prépondérants indiscutablement.

Notre objectif, très limité ici, a pour but la mise en évidence d'interférences dues aux carences en soufre et en phosphore dans le métabolisme des sulfo et phospholipides et de leurs répercusions dans les variations de teneur et composition des divers lipides polaires ainsi que des effets corrélatifs produits par les thalles eux-mêmes.

Méthode d'étude

Les algues récoltées doivent être très jeunes, débarrassées de tous coquillages, le socle enlevé avec les crampons. Les thalles sont alors adaptés au préalable aux conditions de culture expérimentale pendant environ une semaine.

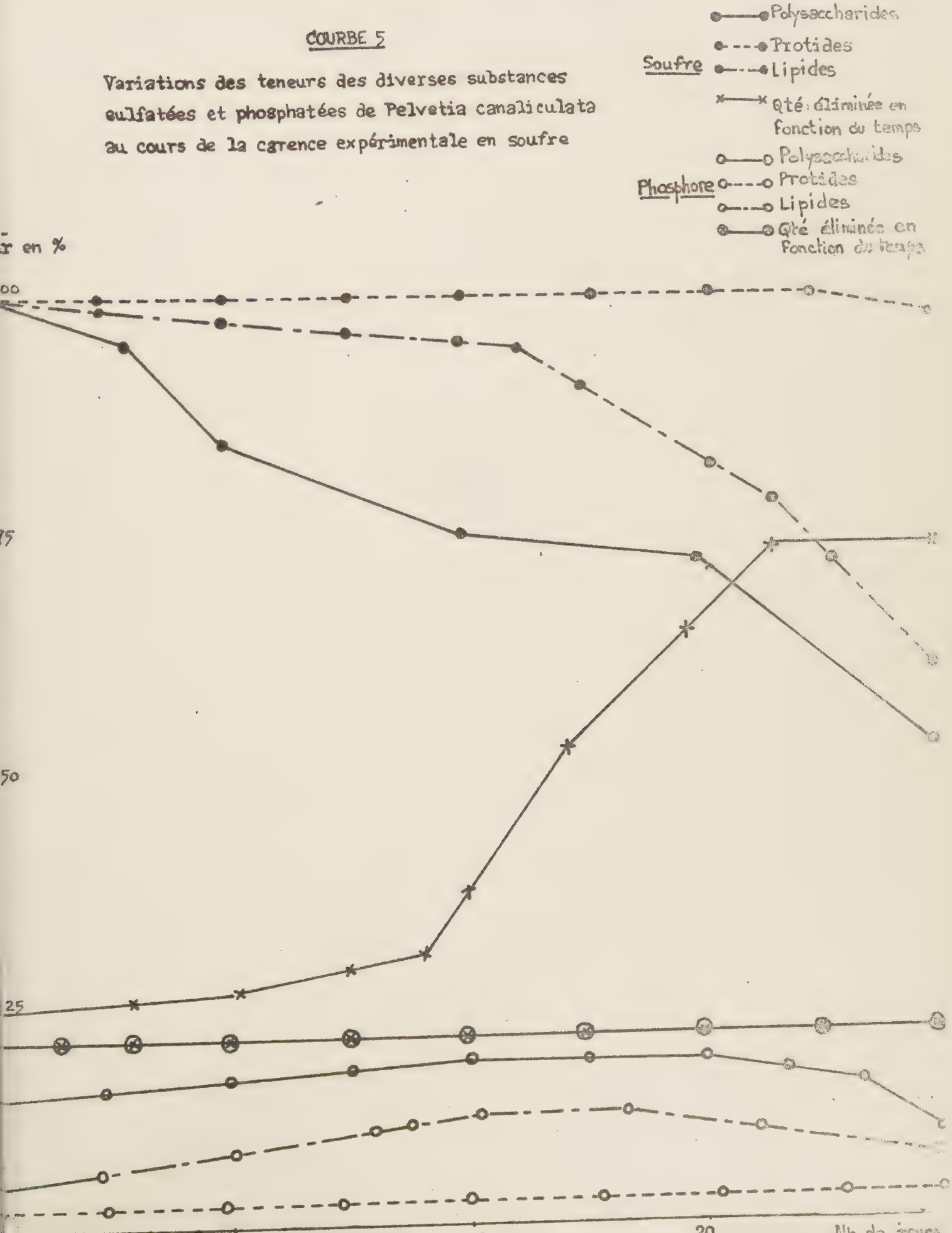
Ces algues sont ensuite divisées en trois lots:

- le premier lot, servant de témoin, est soumis aux conditions normales d'éclairage, d'émersion rythmées et la culture est faite dans l'eau de mer complète.
- le deuxième lot est cultivé dans les mêmes conditions que précédemment, seule l'eau de mer est désulfatée au préalable par barbotage de l'eau de baryte et filtrée.

Le passage de l'eau de mer sur colonne de DOWEX $50H^+$ reliée à une deuxième colonne de DOWEX 50 forme formate, peut être employé aussi, mais cette eau de mer échangée ne peut être utilisée efficacement pour les cultures d'algues car d'autres anions et cations indispensables peuvent être retenus sur ces colonnes en même temps

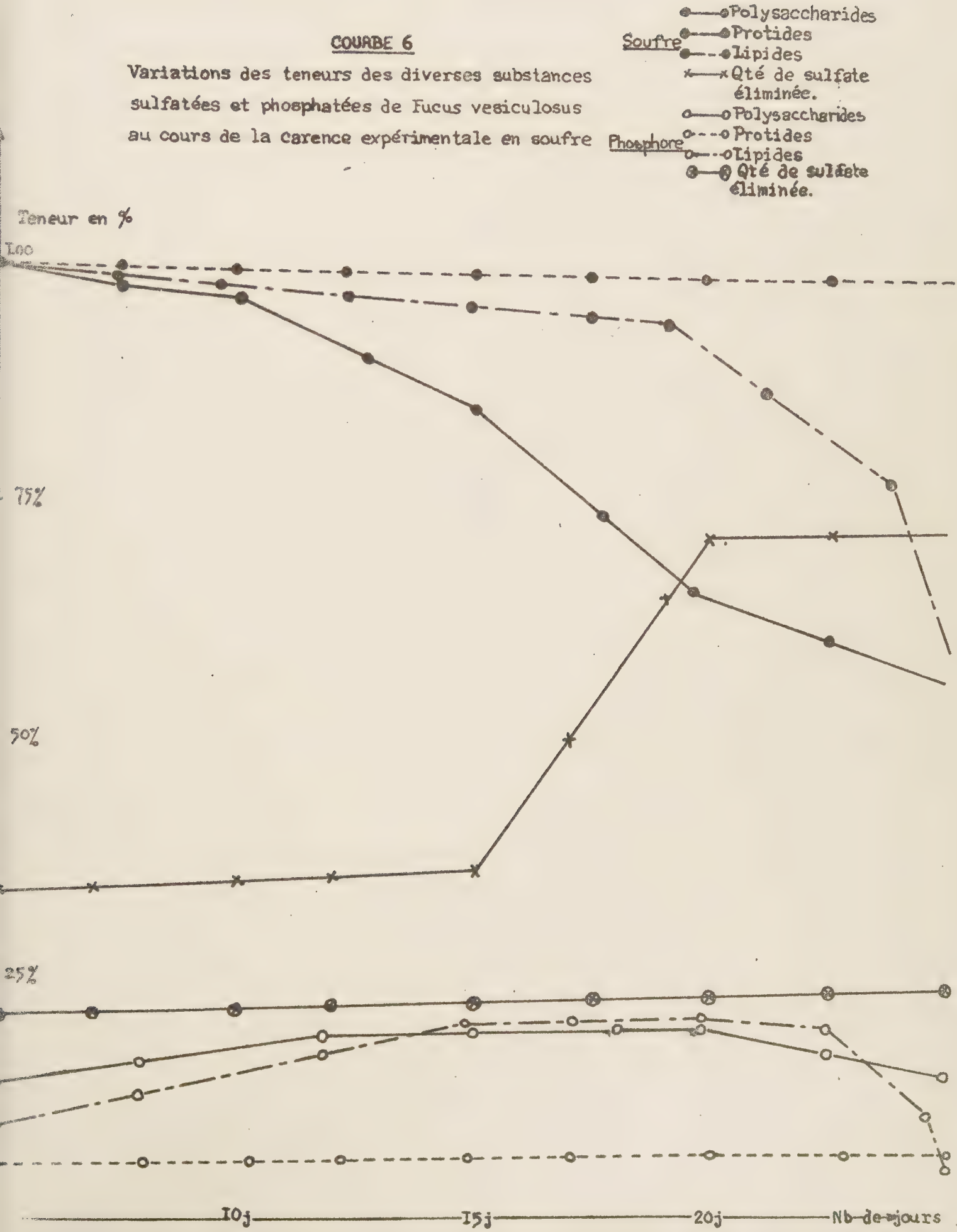
COURBE 5

Variations des teneurs des diverses substances sulfatées et phosphatées de Pelvetia canaliculata au cours de la carence expérimentale en soufre



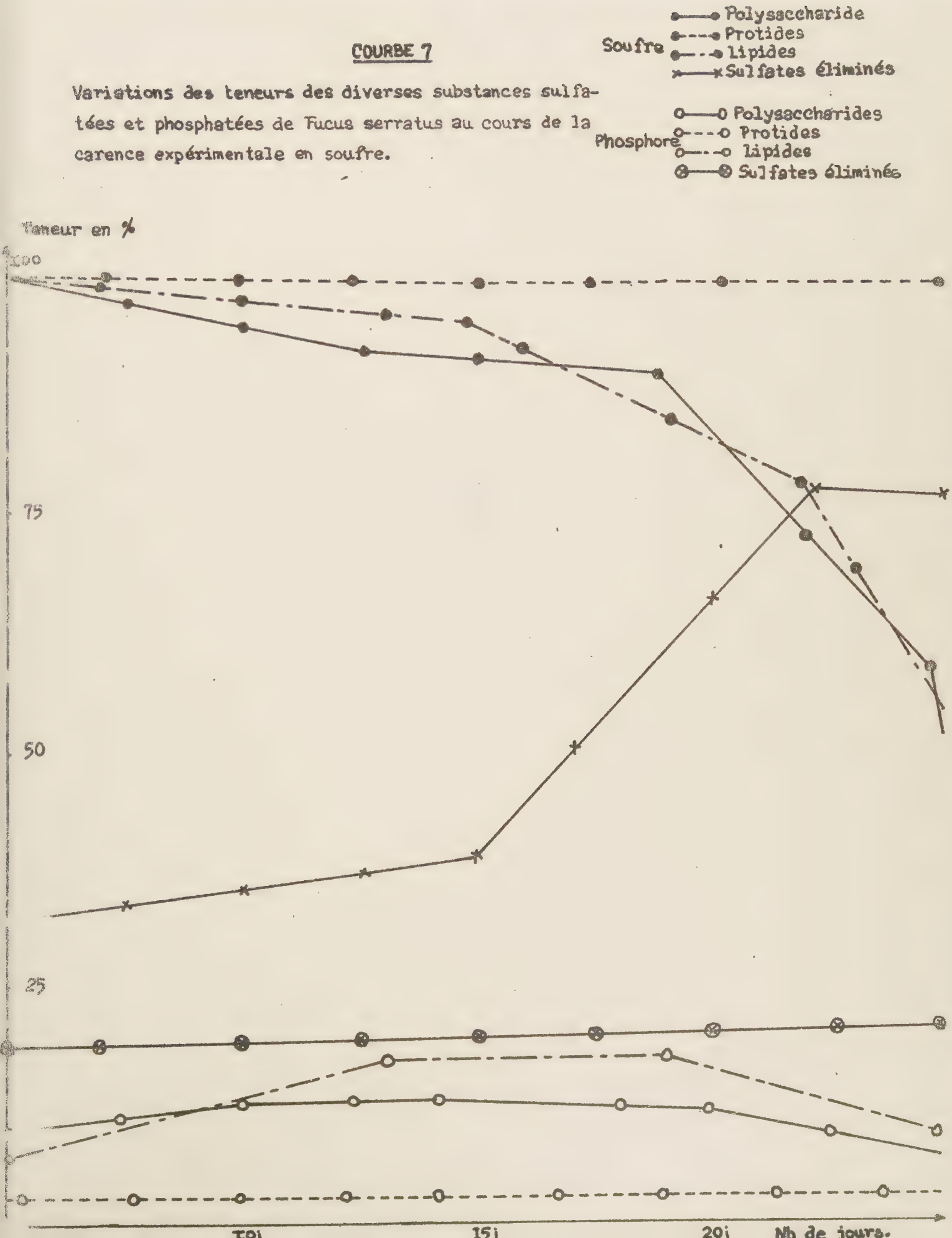
COURBE 6

Variations des teneurs des diverses substances sulfatées et phosphatées de Fucus vesiculosus au cours de la carence expérimentale en soufre



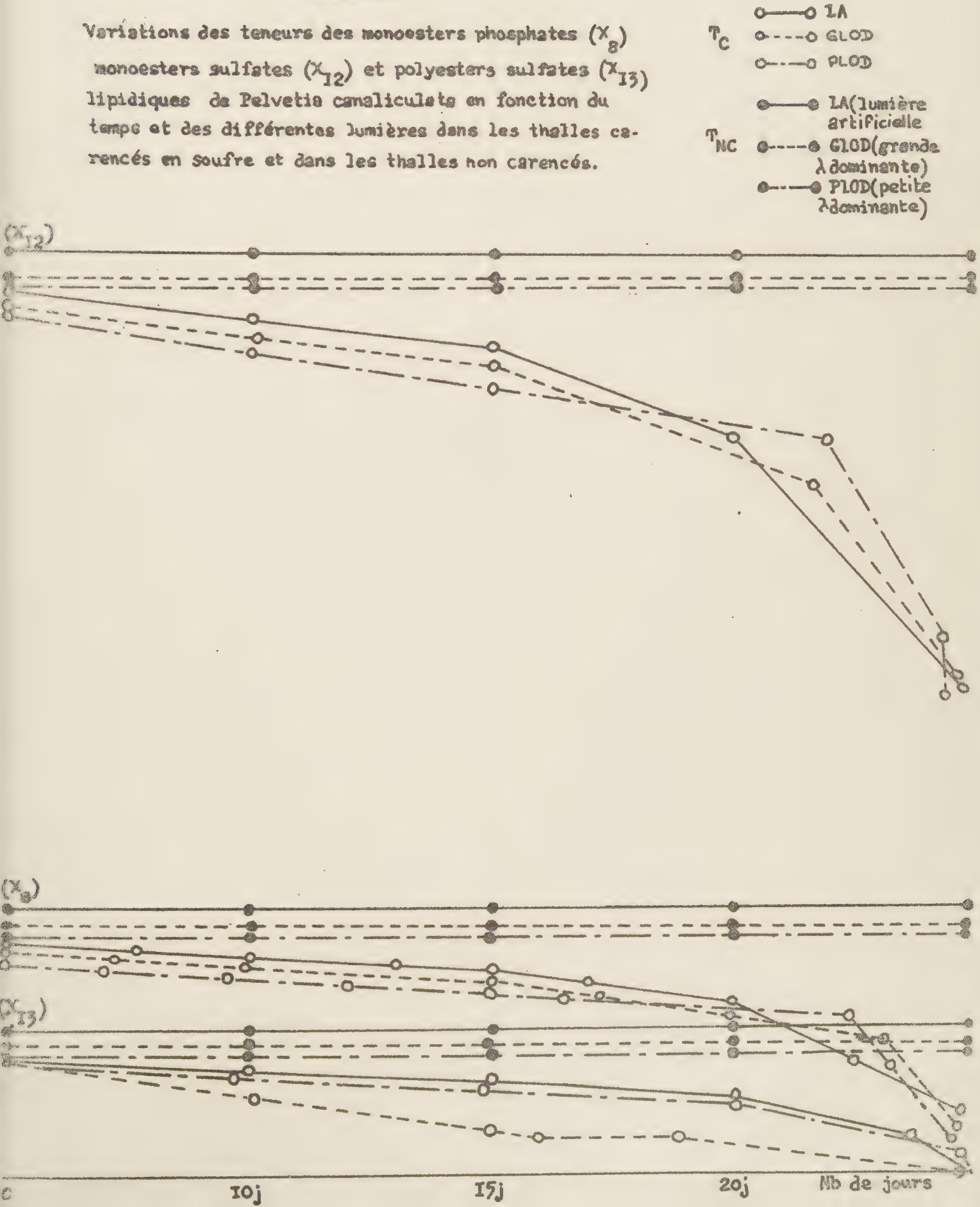
COURBE 7

Variations des teneurs des diverses substances sulfatées et phosphatées de Fucus serratus au cours de la carence expérimentale en soufre.



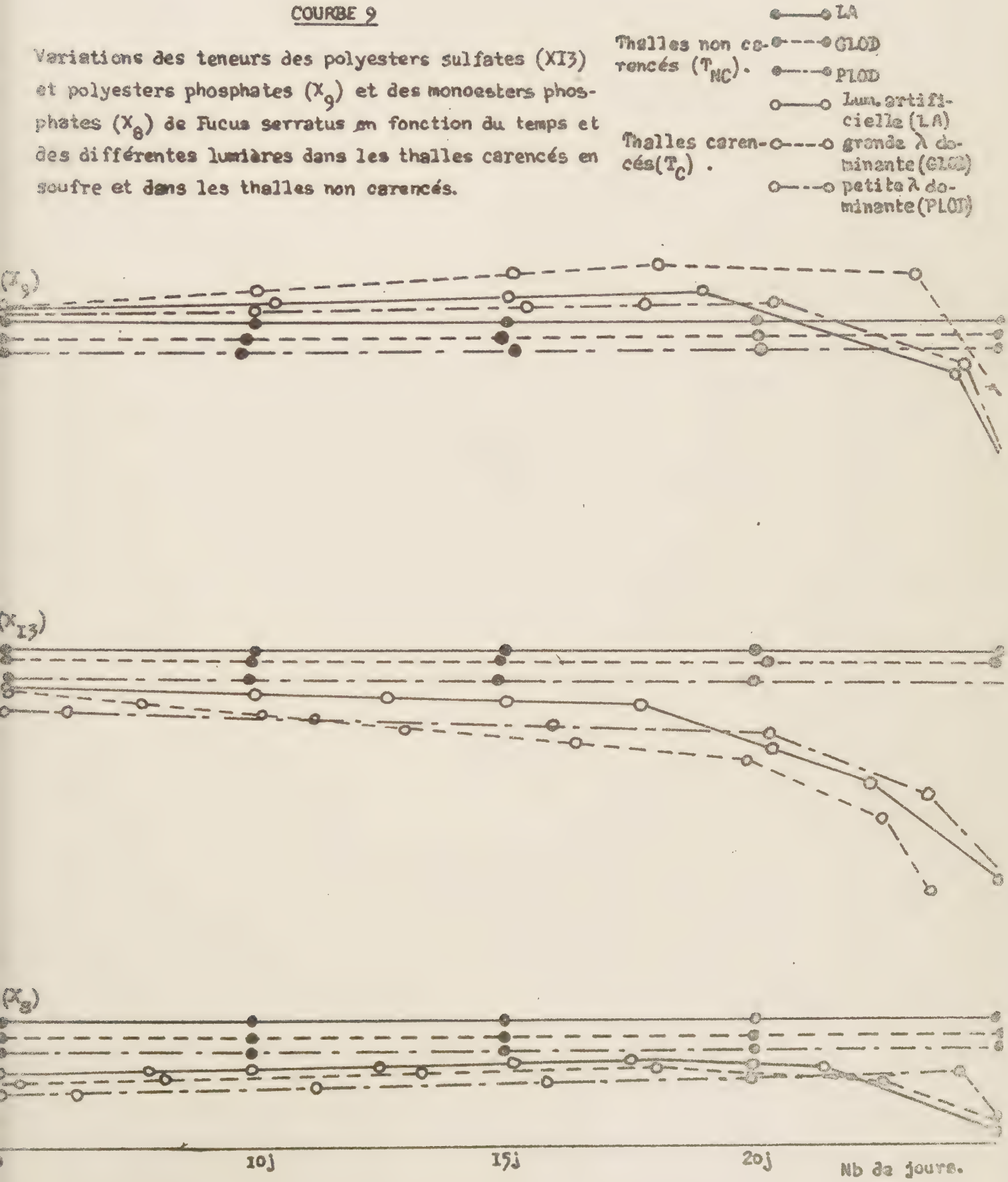
COURBE 8

Variations des teneurs des monoesters phosphates (X_8) monoesters sulfates (X_{I2}) et polyesters sulfates (X_{I3}) lipidiques de Pelvetia canaliculata en fonction du temps et des différentes lumières dans les thalles carencés en soufre et dans les thalles non carencés.



COURBE 9

Variations des teneurs des polyesters sulfates (X_{I3}) et polyesters phosphates (X_9) et des monoesters phosphates (X_8) de Fucus serratus en fonction du temps et des différentes lumières dans les thalles carencés en soufre et dans les thalles non carencés.



que les sulfates. Le déséquilibre ionique est de ce fait important et la croissance des algues ne pourra donc se faire normalement dans ces conditions; nous avons donc préféré la méthode de barbotage dans l'eau de baryte pour désulfater l'eau de mer. Mais avant d'utiliser cette eau, il est indispensable d'ajouter du chlorure de sodium et d'ammonium, à raison de 0,2 Mole/litre d'eau de mer désulfatée.

Les effets de la carence en suufre se manifestent en général après une semaine d'expérience. Les premiers signes sont caractérisés, chez les trois algues, par une faible turgescence des thalles, suivie de leur ter issement ; parfois, un verdissement anormal apparait, notamment chez Fucus serratus, vert olive normalement. Les caractéristiques secondaires, dont les épaississements des caules, la réduction des surfaces des frondes, apparaissent plus tardivement, précédant le blanchiment des thalles, prélude de la mort de la culture.

Les analyses des sulfates synthétisés se font aux trois niveaux suivants:

1) Sulfolipides
2) Protéines soufrées
3) Glucides sulfatés.

Les protéines sont tout d'abord extraites par la méthode classique au phosphate d'ammonium tamponné à pH 4,5 -7,2. Les polysaccharides sont ensuite extraits selon la méthode que nous avons préconisée. Enfin les lipides polaires sont isolés en dernier lieu et analysés; les sulfates étant dosés après hydrolyse oxydative des lipides au spectrophotomètre et par titrimétrie à titre comparatif.

L'analyse des sulfates totaux dans les trois substances isolées, entre le 3 ème et le 25 ème jour de culture, date limite entraînant la mort des thalles, montre que leurs teneurs baissent (voir courbes 4_a, 4_b, 5, 6, 7, 8, 9) chez les 3 algues progressivement, pendant la première semaine de carence. Une baisse brutale a lieu ensuite vers le 7 ème ou le 9 ème jour de l'expérience selon l'espèce, et qui va en s'accentuant lentement d'abord puis très vite entre les 20 ème et 25 ème jours de carence, provoquant le blanchiment total des thalles et leur mort. La répartition de l'abaissement des teneurs en sulfate totaux des protéines, des glucides et des lipides se fait de façon significative chez les 3 algues (tableau XIV et XV).

1) Chez Pelvetia canaliculata, cette diminution de la teneur en sulfates totaux est de 2 - 4 % pendant les 8 premiers jours de

de l'expérience, puis de 15 - 20 % au 10 ème jour. Entre les 10 ème et 15 ème jours de carence, la teneur en sulfates totaux présents est environ de 35 - 40 % inférieure à la normale. Après 20 jours de carence, il ne reste plus que le sixième de la teneur initialeet les thalles meurent rapidement après 25 jours d'expérience.

Les dosages du soufre sous forme sulfures ou soufre moléculaire du milieu de culture, menés parallèllement et pour toutes ces étapes, décèlent une augmentation du soufre dans le milieu proportionnelle aux baisses progressives de teneurs en sulfates totaux de l'algue. Les variations des teneurs en soufre des trois groupes de substances sont les suivantes:

- du premier au septième jour de carence, la teneur en sulfates polysaccharidiques diminue de 6 à 8 %. Les protéines gardent la même teneur en soufre que les témoins. Le soufre lipidique croît de 3 à 4%. L'analyse des lipides polaires indique que pour X_{11} , X_{11}', X_{12} l'augmentation est de 1 à 2 %, X_{13} et X_{14} diminuent de 4 à 6% et X_{10}, X_{15} de 3 % environ. Parmi les lipides du groupe 2, X_6, X_7, X_8 augmentent de 5 à 6 % par rapport à la normale; les X_9 de 4 %; ceux du groupe I, dont X_2, X_3, X_5 de 2 à 4 %; X_1 et X_4 sont de même poids.

- du 8 ème au 10 ème jour de carence, les sulfates polysaccharidiques ont perdu 20 à 30 %. Les soufres protidiques augmentent de 1 %; les sulfates lipidiques de 1,5 à 1,8 % par rapport à la normale. X_{11} , X_{11}', X_{12} ont diminué de 4 à 5 %, X_{13} et X_{14} de 8 à 10 % et X_{15} de 4 % par rapport aux teneurs normales. X_6, X_7, X_8 gagnent toujours 5 - 6 % de plus que la normale; X_9 ont augmenté de 6 %; X_2, X_3, X_5 de 3-5 %; X_1, X_4 marquent une augmentation de 2 % environ par rapport à la teneur initiale.

- du 11 ème au 16 ème jour, les sulfates polysaccharidiques diminuent de plus de 40 % de la teneur initiale. Les taux des protéines soufrées augmentent de 4 à 5 %, ceux des sulfolipides de 8-9 %. Les différents lipides se conservent à peu près identiques à ceux des thalles carencés après 10 jours d'expérience.

L'analyse du soufre du milieu de culture montre une hémorragie en sulfates très importante caractérisant un trouble métabolique profond au niveau des polysaccharides des parois des algues.

L'analyse des lipides phosphorés montre en outre que X_1 et X_4 ont encore augmenté de 3 % environ par rapport aux lots de 10 jours, les autres lipides ont gardé constante leur teneur acquise précédemment.

- du 16 ème au 25 ème jour de carence, les teneurs en sulfates polysaccharidiques sont tombées au niveau le plus bas et sont représentées par 30-35 % de la teneur normale =- celle du début de la période de carence-.

Les soufres protidiques restent quantitativement de même valeur. Les teneur et composition en lipides polaires sont complètement perturbées et le profil de l'équipement lipidique des Pelvetia canaliculata carencés en soufre, à partir du 20 ème jour, ne correspondent en rien au profil normal de cette espèce. Les teneurs en soufre lipidique diminuent de 3-5 % par rapport à la normale après le 20 ème jour de carence et continuent de baisser jusqu'à la mort définitive de la culture.

Parmi les lipides soufrés qui sont encore présents après 20 jours de carence, figurent X_{12} et X_{14}, les autres molécules sont plus ou moins dégradées; les formes lyso sont présentes en grande quantité dans les extraits lipidiques des algues ayant 20 jours de carence.

Pour les acides gras constitutifs des lipides polaires, le rapport des AGS/AGIS est resté voisin de 0,40 tout au long de l'expérience.

Il faut ajouter que la carence en soufre induit une augmentation des teneurs en lipides phosphorés totaux chez Pelvetia canaliculata . Les monoesters phosphates et les polyesters phosphates du groupe 2 étant ceux qui accusent le mieux cette augmentation quantitative. Les monoesters phosphates du groupe I ont faiblement augmenté la variation de leur taux semble liée à l'activité métabolique désorganisée due à la carence en soufre. Pendant le premier temps de l'expérience cette activité métabolique est perturbée. Les variations des teneur et composition en lipides polaires non chloroplastiques sont désordonnées, aboutissant à la mise en place d'une nouvelle structure des équipements polaires de ces organites. Ce nouvel équipement lipidique ne permet qu'une activité limitée et l'assimilation photosynthétique est réduite en conséquence.

2) Chez Fucus vesiculosus, la carence en soufre produit également des troubles graves. Durant les huit premiers jours de carence l'apparence morphologique est visiblement modifiée, les thalles s'allongent , d'aspect frèle, de couleur pâle et peu turgescents.

- Du 15 ème au 25 ème jour de carence, un tiers de la culture meurt lentement, les survivants présentent un aspect rachitique et leu poids sec est réduit de 15 à 20 % par rapport à la nor le. La survie peut durer une dizaine de jours environ mais après 30 jours de carence la culture meurt en quasi totalité.

. L'analyse des lipides polaires totaux montre une chute de 2 - 3 % durant les huit premiers jours, puis de 5 - 6 % vers le 20 ème jour. Une augmentation a lieu ensuite, progressivement, qui se stabilise à 4 % en dessous de la teneur normale, jusqu'à la veille de la mort de la culture.

. Les phospholipides totaux augmentent de 4 - 5 % au début de la carence puis de 6 - 7 % au 20 ème jour de l'expérience, pour se fixer ensuite à 6 % au dessus de la normale. Les teneurs en X_1, X_4, X_5 augmentent de 8 - 9 % durant les dix premiers jours, puis une baisse s'amorce au 12 ème jour de carence, et se meintient vers 3 % jusqu'à la fin de l'expérience. Celles de X_2, X_3, X_6, X_7, X_8 gagent de 2 à 3 % à partir du 6 ème jour puis varient peu durant toute la fin de l'expérience.

La teneur en lipides soufrés totaux diminue progressivement de 3-4% à partir du 5 ème jour de carence, et vers le 12 ème jour se fixe aux environs de 3 % au dessous de la normale. Les quantités de X_{12}, X_{11}, $X_{11'}$ baissent de 2 - 2,5 % , X_{13} ne sont plus représentés qu'à 45 - 50 % de leur teneur initiale. X_{14} et X_{15} ont par contre augmenté de 1 % par rapport aux témoins. Les sulfates non lipidiques diminuent lentement pendant les 10 premiers jours de carence: de 8 - 10 % puis de 35-40% après 20 jours d'expérience. Enfin à partir du 25 ème jour, les sulfates non lipidiques sont seulement représentés au quart de la teneur initiale.

Pendant les 10 à 15 premiers jours de carence, le soufre éliminé dans le milieu de culture est principalement sous forme de sulfure et de sulfite. Ce milieu usé ne peut servir à la culture de thalles normaux car des symptômes de carence manifestes apparaissent après 7 à 10 jours de culture, tout comme si le soufre n'était pas présent dans le milieu. Le soufre éliminé par les Fucus vesiculosus carencés après 20 jours d'expérience est au contraire en grande majorité sous forme de sulfates. Le milieu de culture usé après 20 jours d'étude peut servir de source de sulfate aux cultures des thall

TABLEAU XIV

Effets de la carence en soufre sur les variations des teneur et composition en lipides polaires des trois Fucacées étudiées, et en fonction du temps.

Espèces. / Lipides.		Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux avec pigments polaires (ap)											
		Pelvetia canaliculata				Fucus vesiculosus				Fucus serratus			
		T	I-7j	8-16j	17-25j	T	I-7j	8-16j	17-25j	T	I-7j	8-16j	17-2
GrI	X_1	1,00	1,00	1,20	0,48	1,50	1,62	1,60	1,58	2,00	2,10	2,02	1,70
[illegible]	[illegible]	2,10	,16	2,20	0,96	2,51	2,54	[illegible]	[illegible]	2,01	2,08	[illegible]	[illegible]
Gr2	X_{15}	2,02	2,10	1,98	[illegible]	1,5[illegible]	1,4[illegible]	1,40	[illegible]	1,5[illegible]	1,[illegible]	1,4[illegible]	0,9[illegible]
GrI	X_2	1,00	1,05	1,08	0,37	1,00	1,03	1,01	[illegible]	2,50	2,55	2,04	1,92
	X_3	1,50	1,55	1,61	0,62	2,02	2,10	2,07	0,94	[illegible]	2,02	1,98	0,95
	X_4	2,00	2,00	2,05	0,39	1,50	1,65	1,63	1,40	1,50	1,54	1,52	1,05
	X_5	2,68	2,70	2,70	0,67	3,00	3,15	3,18	2,70	3,50	3,60	3,54	2,70
Séries2 Gr2	X_6	2,05	2,20	2,18	0,12	3,34	3,40	3,36	2,85	1,00	1,08	1,02	0,80
	X_7	3,07	3,30	3,16	0,90	5,59	5,65	5,64	4,10	1,53	1,55	1,46	0,[illegible]
	X_8	5,04	5,40	5,10	0,79	6,61	6,72	6,69	5,10	2,54	2,56	2,45	1,80
	X_9	2,50	2,60	2,[illegible]	1,35	0,00	0,00	0,00	0,00	16,05	16,50	16,2[illegible]	9,20
Gr3	X_{11}	2,45	2,45	2,35	0,50	2,47	1,92	1,80	0,95	1,50	1,46	1,36	0,50
	X_{12}	2,98	3,00	2,70	0,28	4,79	4,25	3,97	1,59	1,00	1,00	0,[illegible]	0,27
	X_{13}	19,30	19,35	19,10	12,00	13,25	12,95	12,60	9,68	2,01	1,98	1,96	1,30
	X_{14}	2,98	2,[illegible]0	2,78	0,50	1,00	0,60	0,43	0,12	10,12	10,02	9,98	7,60
		2,00	1,95	1,82	1,30	1,00	1,04	0,90	0,45	2,50	2,40	2,36	0,89
SL_T/100g LI_T		31,52	31,50	28,50	23,20	24,08	23,00	24,80	19,05	18,53	18,48	17,75	14,80
PL_T/100g LP_T		22,94	23,50	23,40	20,00	27,17	27,00	28,20	27,50	34,59	35,00	35,20	26,00
LI_T/100g LT		19,80	19,85	19,50	16,00	22,30	22,00	21,00	21,30	25,85	25,90	24,50	22,00
Polysaccharides sulfates		18,00	17,90	10,00	5,40	16,50	15,89	11,50	5,3[illegible]	14,50	13,00	12,00	6,70
Soufre protidique.		0,82	0,82	0,80	0,80	0,83	0,83	0,80	0,75	0,84	0,86	0,80	0,79
Poysaccharide phosphates.		14,00	14,20	14,15	14,05	14,50	14,80	14,60	14,50	15,50	15,55	15,45	15,48
P non lipidique		0,71	0,71	0,70	0,72	0,72	0,72	0,74	0,70	0,74	0,74	0,72	0,74
AGS/AGIS LP_T.		0,40	0,38	0,39	0,39	0,36	0,36	0,34	0,36	0,33	0,34	0,34	0,34
AGS/AGIS GrI.		0,40	0,36	0,34	0,37	0,34	0,34	0,32	0,33	0,36	0,34	0,35	0,34
AGS/AGIS Gr2.		0,39	0,38	0,38	0,36	0,35	0,30	0,31	0,34	0,35	0,32	0,33	0,39
AGS/AGIS Gr3.		0,39	0,40	0,38	0,36	0,34	0,35	0,37	0,35	0,38	0,35	0,36	0,40

Nota. T = Témoins non carencés.-P non lipidiques=phosphates non lipidiques.

TABLEAU XV

Variations des teneur et composition en lipides polaires en fonction du temps et des différentes lumières chez les thalles carencés en soufre pendant I5j et chez les thalles non carencés des trois Fucacées choisies.

Poids par I00grammes de lipides polaires totaux avec pigments polaires (ap)

	Pelvetia canaliculata						Fucus vesiculosus						Fucus serratus					
	LA		GLOD		PLOD		LA		GLOD		PLOD		LA		GLOD		PLOD	
	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C
	-	I,2	I,04	I,08	I	I	I,5	I,6	I,55	I,60	I,53	I,5I	2	2,02	2,04	2,08	2	I,98
	-,I	2,2	2,I6	2,I8	2,08	2,06	2,5I	2,I	2,6	2,64	2,56	2,54	2,0I	2,04	2,03	2,I0	2	I,99
	-,0-	I,98	2,05	2	2,04	I,98	I,50	I,4	I,5	I,45	I,47	I,49	I,50	I,42	I,52	I,48	I,5	I,58
	I	I,08	0,97	2,05	I	0,98	I	I,0I	I,0I	I,04	I	0,94	2,50	2,04	2,55	2,62	2,5	2,42
	I,30	I,6I	I,46	I,48	I,50	I,48	2,02	2,07	2,03	2,09	2,04	2	2	I,88	2,03	2,I0	2,05	I,98
	2	2,05	I,95	2,02	2,0I	I,97	I,5	I,63	I,49	I,54	I,52	I,48	I,50	I,52	I,53	I,56	I,55	I,50
	2,68	2,70	2,62	2,70	2,76	2,74	3	3,I8	2,97	3,02	3,04	-,98	3,50	3,54	3,57	3,60	3,5	3,35
	-,05	-,I8	-,04	2,06	I,87	I,88	3,34	3,38	3,3I	3,34	3,30	3,27	I	I,02	0,95	I	0,9	0,89
	3,07	3,26	3,04	3,05	2,79	2,79	5,59	5,64	5,47	5,48	5,49	5,47	I,53	I,48	I,53	I,55	I,48	I,45
	5,-4	5,40	5,05	5,08	4,60	4,6I	6,6I	6,69	6,54	6,56	6,47	6,42	2,54	2,45	2,54	2,54	2,47	2,44
	-,50	-,68	2,42	2,40	2,56	3,02	0	0	0	0	0,03	0,I2	I6,05	I6,2	I5,9	I5,I	I6,5	I7,75
I	2,45	2,35	2,5I	2,50	2,47	2,45	2,47	I,80	2,52	2,50	2,25	2,I3	I,50	I,36	I,83	I,82	I,47	I,45
II	2,98	2,70	2,9I	2,88	2,95	2,92	4,79	3,97	5,05	5	4,55	4,50	I	0,80	I,92	I,90	I	I
	I9,3	I9,I	2I	20,98	I9,45	I9,39	I3,85	I2,6	I4,25	I4,2	I2,8	I2,76	2,0I	I,96	2,54	2,50	I,97	I,94
3	2,98	2,78	2,90	2,30	3,I0	2,98	I	0,43	0,93	0,42	I,04	I	I0,I2	9,98	9,90	7,80	I0,12	I0
4	2	I,82	I,92	I,80	2,05	2,0-	I	0,9	0,94	0,45	I,05	I,02	2,50	2,36	2,48	I,30	2,54	2,50
T	3I,5	28,5	32,8	3I,4	32,4	3I,7	23,2	22,8	26,4	25,I	23,I	22,9	I8,5	I7,7	I8,6	I6,8	I8,5	I8,25
T	23,9	23,I	22,7	24,I	22,9	22,55	20	28,2	26,5	27,3	26,9	26,7	34,5	35,2	33,5	34,3	34,9	37,75
T	I9,8	I9,5	I9,8	I9,2	I9,7	I9,3	24,3	2I	22,3	2I,8	22	2I,7	25,8	24,5	24,9	24,5	25,5	25
nc de te	I8	I0	I8	I0	I7,9	I0,I	I6,5	II,5	I6,2	I0	I6,3	9,8	I4,50	I2	I4,2	II,8	I4,4	I2,I
s te	2,8	2,75	2,70	2,68	2,72	2,70	2,70	2,68	2,69	2,60	2,70	2,62	2,66	2,66	2,65	2,60	2,67	2,63
ine ée	0,82	0,82	0,82	0,82	0,80	0,8I	0,83	0,83	0,82	0,83	0,84	0,82	0,84	0,80	0,83	0,82	0,80	0,82
ac de h'e	I4	I4,8	I4,5	I5	I4,6	I4,65	I4,5	I4,8	I5	I5,3	I5	I4,9	I5,5	I4,5	I4,-	I5	I4,7	I4,9
e	3	3,5	3,55	3,9-	3,48	3,58	3,4	3,54	3,5	3,5-	3,52	3,56	3,20	3,45	3,30	3,32	3,3-	3,38
lip	0,7	0,7I	0,7I	0,70	0,7I	0,7I	0,7I	0,7-	0,74	0,74	0,73	0,70	0,74	0,76	0,74	0,75	0,7-	0,74

ota. L = Lumière artificielle-GLOD,PLOL = lumière à grande longueur d'onde ou petite longueu d'onde dominante-L_T,$\frac{1}{2}L_T$,SL_T= lipides totaux,sulfo et phospholipides totaux-Pnon lip = phosphore non lipidique.

non carencés à l'exclusion de tout autre apport en sulfates. Les algues carencées, au contraire, ne peuvent utiliser ces sulfates et meurent toute d'inanition bien que les sulfates éliminés soient présents dans le milieu de culture. Il n'est pas impossible que les thalles carencés aient ainsi perdu leur apacité d'assimiler les sulfates et cette perte serait irréversible après un certain temps de carence. Pour mettre en évidence l'incapacité d'assimilation des sulfates, quasi totale des Fucus vesiculosus , après 20 jours de carence en soufre, nous avons essayé d'en replacer certains dans un milieu: eau de mer complète contenant des sulfates. Les résultats obtenus sont les suivants:

1) Durant les huit premiers jours,de carence, les thalles reprennent relativement vite et semblent devenir normaux en 4-5 jours. Les teneur et composition en lipides polaires reprennent vite leurs valeurs initiales. Les algues n'ont aucune exigence particulière par suite de cette carence limitée en soufre: celle-ci ne semble pas avoir affecté profondément les thalles de 'expérience.

2) Entre huit et douze jours de carence, les cultures repartent difficilement en présence de sulfate de sodium. La moitié des algues meurent; les survivantes présentent des troubles graves mais avec un mélange équimolaire en sulfates de sodium, de magnesium et d'ammonium,,la reprise est plus rapide et plus efficace.

3) Après 15 jours de carence, les thalles ne paraissent plus réagir quelques soit le milieu utilisé. Les thalles carencés pendant plus de 12 jours ont vraisemblablement perdu leur faculté d'assimilation des sulfates, perte irréversible chez Fucus vesiculosus. Pour Pelvetia canaliculata, cette perte se manifeste aussi mais plus tardivement, et les exigences sont moins impérieuses quant à la qualité des sulfates fournis. Souvent le sulfate de sodium fourni seul dans le milieu suffit à faire repartir les cultures carencées, même après 15 jours.

Les acides gras constitutifs des lipides polaires des Fucus vesiculosus carencés présentent une faible variation du degré de saturation

potentielle par rapport à ceux des algues non carencées ; leur apport AGS/AGIS reste voisin de 0,38.

Le taux en soufre protidique a très peu varié. Après 20 jours de carence, une baisse de 1 % par rapport à la teneur normale a été constatée , puis entre 20-25 jours, cette diminution s'accentue rapidement, atteignant après le 25 ème jour de carence, 5 - 6 % en dessous de la valeur initiale. La baisse subite de la teneur n soufre protidique coïncide avec la perte de la capacité d'assimilation des sulfates par les thalles carencés.

3) Chez Fucus serratus, la carence en soufre provoque aussi des troubles très graves, la tolérance semble toutefois plus grande que chez les deux premières espèces. Durant les dix premiers jours de l'expérience, les cultures n'ont manidesté aucun trouble apparent sinon un verdissement anormal des thalles.

Entre lès 15 ème et 20 ème jours de carence, les caules s'allongent tout en réduisant la surface des thalles, leur couleur devient d'un jaune orangé caractéristique.

Après 25 jours de carence, les thalles commencent à perdre leur turgescence, devenant de plus en plus flasques.

L'analyse des lipides polaires, pendant les 30 jours de carence en soufre, montre une évolution sensiblement différente comparativement aux deux algues précédentes. Durant les 20 premiers jours, les sulfates polysaccharidiques ont diminué progressivement, atteignant 40-45 % en dessous de la normale au 22 ème jour de carence. Le soufre protidique gagne 2 % avant de baisser après 3 jours d'expérience, de 1 - 2% en dessous de la normale, cette valeur reste inchangée jusq'à la fin de l'expérience. Les sulfates lipidiques subissent une chute de 1 - 1,5 % durant les dix premiers jours de carence, puis après 15 jours, une nouvelle baisse a lieu brutalement, soit 6 % par rapport à la normale. Enfin cette teneur se stabilise jusqu'à la mort de la culture annoncée par l'hémorragie importante en sulfates non lipidiques. Les lipides polaires totaux ont subi à partir du 6 ème jour de carence une diminution de 4 - 5 %, se stabilisent autour de 5 % en dessous de la normale jusqu'au 25 ème jour de carence. A partir de ce moment la désorganisation structurale des lipides commence. Les phospholipides totaux gagnent, comme chez les algues précédentes, 5 % progressivement du 4 ème au 10 ème jour de carence et se stabilisent jusqu'à la dégénerescence de la culture. Les quantités en

X_1, X_5, X_4 ont d'abord augmenté de 4-5% 48 heures après la mise en carence de la culture. Leur diminution s'amorce ensuite vers le 8 è jour puis se maintient constante ensuite de 3 % au dessus de la normale, jusqu'aux premiers signes de dégénérescence de la culture. Celles de X_2 , X_3 , X_9 , X_8 et X_6 augmentent d'abord de 1 - 2 % puis entre le 20 ème et le 25 ème jour de l'expérience diminuent assez lentement au début puis rapidement à partir du 30 ème jour de carence. La mort de la culture est déterminée à partir de ce moment. les Sulfolipides totaux perdent dès le 6 ème jour de carence de 3 - 4 %, vers le 12 ème jour, cette teneur revient à 2 % en dessous de la normale, s'y maintient jusqu'au 26 ème jour de carence; au delà les premiers signes de dégénérescence se manifestent. X_{12}, X_{13} chutent de 4 %: X_{11}, X_{14} de 1 %; X_{15} ont par contre augmenté de 3 % environ, cette variation débute 6 à 8 jours après la mise en carence. Les dégradations des sulfolipides se manifestent en tout premier lieu vers le 20 ème jour et précèdent un trouble métabolique caractérisé, aboutissant à une"hémorragie" abondante des sulfates.

La remise dans un milieu complet des cultures carencées en soufre montre que la reprise est facile et rapide après 15 jours d'expérience: les Fucus serratus , pendant toute cette période, ayant subi probablement des troubles métaboliques et physiologiques moins profonds que les deux premières algues. Leur exigence est aussi moins grande comparativement car l'eau de mer naturelle suffit à faire repartir très rapidement les cultures carencées, alors que chez les deux premières espèces, il faut enrichir l'eau de mer en sulfates de sodium et de calcium pour Pelvetia canaliculata et d'un mélange plus complexe contenant en plus du sulfate d'ammonium pour Fucus vesiculosus.

Entre 20-25 jours de carence en soufre, Fucus serratus devient plus difficile à récupérer et les plantes se montrent alors plus exigeantes que les deux autres espèces. Le milieu enrichi en sulfates de sodium , de calcium et d'ammonium ne suffit plus, un apport supplémentaire en magnésium sous forme de sulfate et en chlorure de potassium permet une meilleure reprise, mais le pourcentage des survivants reste peu élevé.

Les acides gras constitutifs des lipides polaires totaux ici ont une faible tendance à l'insaturation potentielle par rapport à la normale. Le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,22 contre 0,26 normalement.

Conclusions

La carence en soufre provoque chez les trois espèces des troubles métaboliques profonds conduisant à la mort des thalles. Ces troubles sont traduits extérieurement par le palissement de la couleur, une perte d'eau intracellulaire résultant de l'"hémorragie" en sulfates polysaccharidiques des parois des thalles. Outre ces modifications apparentes, communes aux trois espèces, nous avons observé certaines transformations morphologiques particulières à chaque algue dont l'allongement des caules chez Fucus vesiculosus et la réduction des surfaces des frondes chez Fucus serratus.

Le blanchiment des thalles et la perte de la turgescence sont les signes avant coureurs de la mort de ces cultures.

L'analyse des diverses substances biochimiques constituant ces organismes, dont les protides, glucides et lipides plus particulièrement revèle en outre que la carence en soufre affecte notablement taux et composition de ces macromolécules, que ces très sensibles variations sont causes ou effets des inconforts physiologiques ressentis par les thalles pouvant entraîner des troubles physiologiques mortels. Ces variations en teneur et composition apparaissent toujours de la même façon, chez les trois algues et dans un même ordre de succession, à savoir:

1) Dans un premier temps de carence: les lipides de la première série sont d'abord atteints quantitativement ainsi que les lipides constitutifs des mitochondries et des autres formations cytoplasmiques non chloroplastiques. Les lipides polaires des chloroplastes sont ensuite remaniés qualitativement et quantitativement.

   Tout d'abord sont transformés les lipides majoritaires dont les variations sont néanmoins peu profondes, comparativement à celles des lipides minoritaires. Parmi ces lipides majoritaires, ce sont les monoesters sulfates du groupe 3 de Pelvetia canaliculata et de Fucus vesiculosus ; pour Fucus serratus, ce sont les polyesters sulfates dont les teneurs diminuent rapidement dès les 8 premiers jours de carence en soufre. Selon l'espèce considérée ces diminutions sont de l'ordre de 2 - 5 % mais tant que cette teneur est maintenue, la vie des algue est encore possible. La durée de survie varie avec l' s

l'espèce; Fucus serratus est plus apte à supporter une carence en soufre allant de 3 semaines à 35 jours; P. canaliculata et F. vesiculosus peuvent rarement vivre plus d'un mois dans ces conditions.

2) La teneur en protéines soufrées est modifiée en dernier, mais l'amplitude de sa variation reste faible quelle que soit l'espèce. Pendant les 15 premiers jours de carence, cette teneur en protéines soufrées diminue d'environ 0,5-1 % mais, tant que le taux des sulfates lipides ne s'abaisse pas à plus de 2 - 5 % de sa valeur initiale, la teneur en protéines soufrées reste inchangée.

3) Les sulfates polysaccharidiques des parois subissent des variations quantitatives importantes et presque simultanées aux diminutions de teneur en glucides sulfates intracellulaires entraînant à leur tour la chute progressive des sulfolipides. Les étapes d'évolution se résument comme suit:

   . Entre 4-8 j.: forte diminution des sulfates polysaccharidiques, mais cette variation se fait lentement et progressivement. Les sulfolipides ont aussi subi des diminutions faibles et très lentes. Les protides restent inchangés.

   . Entre 8 -15 jours de carence: baisse rapide de la teneur en sulfates polysaccharidiques, les sulfates se maintiennent au même taux, les protides soufrés restent en quantités égales à celles du début de l'expérience.

   . Entre 16 et 20 jours de carence, les sulfates polysaccharidiques ont perdu plus de 35 % de leur quatité initiale. La baisse de la teneur en sulfolipides survient subitement et s'accélère. En 24 heures, nous avons enregistré une diminution de 8-10 % du taux initial. A partir de ce moment, la teneur des protéines soufrées diminue rapidement et la mort de la culture débute par les symptômes signalés ci-dessus.

Une forte quantité de protéines soufrées est libérée dans le milieu quelques heures avant la dégradation généralisée des sulfolipides.

Il faut ajouter aussi que la carence en soufre stimule en quelque sorte la biosynthèse des phospholipides totaux. Ces derniers augmentent rapidement de 4 - 6 % dès le troisième jour de carence. Parmi les lipides phosphorés remaniés quantitativement, d'abord les polyesters phosphates gagnent. Ce gain des teneurs en polyesters phosphates est très sensible si on soumet les cultures carencées à diverses lumières qualitativement et quantitativement différentes. En temps normal, les polyesters sulfates et phosphates sont fonctionnels en présence de lumières à grande longueur d'onde et leurs teneurs varient avec la quantité de ces lumières des sources d'éclairage. De même, les monoesters sulfates et phosphates sont fonctionnels normalement en présence de lumières à courtes longueurs d'onde et quelle que soit l'espèce considérée. Lors de la carence en soufre, si les cultures sont en outre soumises soit à des éclairages riches en lumières de grandes longueurs d'onde soit à des lumières de courtes longueurs d'onde, les taux en polyesters lipides sont seuls soumis à variations. Les polyesters phosphates sont très sensibles aux qualités et quantités de lumière; les polyesters sulfates le sont nettement moins. Les monoesters sulfates et phosphates ne paraissent pas réagir.

Ces divers phénomènes dus à la carence en soufre ont été observés chez les trois espèces indifféremment; seule leur ampleur varie suivant l'espèce carencée.

Il est donc probable que durant la carence en soufre les polyesters phosphates assurent la majeure partie des fonctions au sein des chloroplastes, fonctions partagées avec les polyesters sulfates en temps normal. Les monoesters sulfates et phosphates ne sont pas fonctionnels quelles que soient les lumières utilisées, durant la carence, probablement afin d'augmenter la rentabilité des dépenses énergétiques et d'en limiter le gaspillage.

Enfin, signalons avant de clore cette étude, que le soufre

éliminé par les thalles carencés, quelle que soit l'espèce considérée, est sous forme plus ou moins réduite.

Ainsi:

. Le soufre éliminé après 15-25 jours de carence peut être réutilisé par des thalles en culture et aucun signe de carence n'apparaît même si on utilise cette source unique de sulfates pendant longtemps. L'analyse montre qu'il s'agit de soufre éliminé sous forme oxydée principalement dans le milieu de culture. Tout se passe comme si ces algues carencées perdent totalement en 15-25 jours leur capacité d'assimiler les sulfates. Ceux-ci sont donc éliminés, en grande quantité, dans le milieu sans être réutilisés.

. Le soufre éliminé entre 4-8 premiers jours sont difficilement réutilisés par les thalles non carencés. En effet, si on le distribue aux cultures normales comme source unique en approvisionnement en sulfates, des signes de carence apparaissent rapidement et tout se passe comme si ces thalles étaient à leur tour carencés en soufre. L'analyse de ce soufre éliminé durant les premiers jours de l'expérience indique qu'il existe ici sous forme de sulfites, sulfures et même soufre moléculaire.

. L'ensemble de toutes ces considérations concourent à montrer que:

1°) Les algues non carencées, quelle que soit l'espèce, ne peuvent utiliser le soufre que sous les formes oxydées (sulfates ou sulfonates ...). Les formes réduites ne sont pas assimilées normalement et sont même toxiques pour les algues non carencées à forte concentration.

2°) Les algues carencées perdent peu à peu leur capacité d'assimiler les sulfates. Cette perte devient irréversible à partir d'un seuil entraînant la baisse rapide de teneur en sulfolipides: prélude à la mort des thalles et marque d'un trouble profond des métabolismes des molécules soufrées. Celles-ci apparaissent donc indispensables à la vie de l'algue.

B) Carence en phosphore

On sait depuis longtemps que le phosphore est un élément présent dans toutes les substances vivantes, indispensable à la nutrition des animaux et des végétaux. BRANDT en 1969 (102) l'a mis en évidence dans l'urine, MARGRAEF a décrit un cycle du phosphore allant du monde minéral au monde animal , passant par le monde végétal puis retournant au monde minéral Mais c'est de SAUSSURE qui a établi l'évidente nécessité du phosphore dans le développement des êtres vivants animaux et végétaux.

Du point de vue biochimique, le phosphore existe sous trois formes principales largement distribuées dans les composés organiques des divers tissus.

Tout d'abord, les phosphates minéraux donnent avec la baryte des sels de baryum insolubles. Puis les phosphates organiques dont les sels de baryum sont peu solubles ou solubles. Enfin des formes semi-minérales de l'acide phosphorique, engagé dans un sel mixte avec un cation bivalent , en l'occurence le calcium ou le magnésium. Ceux-ci peuvent former avec les acides gras ou les acides phosphatidiques des substances lipidiques phosphatées solubles dans les solvants organiques. Ces lipides phosphatés existent souvent sous forme de mono- di- ou tri-esters avec des alcools primaires ou secondaires. Ils peuvent aussi exister sous forme d'esters pyrophosphates ou triphosphates dans les nucléosides. Les liaisons O-P et O-N, des phosphoamides des phosphagènes par exemple, sont depuis longtemps connus et leur rôle est essentiel. Il en est de même des liaisons P-S dans les thiols esters phosphates où PO_4H_3 est attaché à une cystine par l'intermédiaire d'une liaison P-S. La liaison P-C connue dans les dérivés des phosphoéthanolamine et sérine dont l'acide amino-éthyl phosphorique et l'acide amino 2 phosphono -3-propionique ont été identifiés dans les produits d'hydrolyse des phospholipides. Le rôle du phosphore dans toutes ces substances est primordial. Les intermédiaires métaboliques des glucides , protides et lipides phosphatés, ainsi que de nombreux coenzymes en fournissent des exemples probants, dans lesquels l'interaction: pôle de protéines enzymatiques / pôle ammonique phosphorique est spécifique.

Les phospholipides en tant que macromolécules liées aux protéines cellulaires et sous forme circulant dans le milieu intérieur interviennent au niveau des cenapses lipoprotidiques. Dans ces cénapses

des liaisons anioniques (lysine) et cationiques (protéines) sont engagées. Elles en sont détachables cependant par action de détergents. Cette possibilité d'association: phospholipides / molécules polaires permet l'entraînement dans les phases lipidiques de complexes insolubles qui ne pourraient y pénétrer seuls. D'où l'importance en physiologie cellulaire de ces lipides polaires. Le rôle des esters phosphates, des esters sulfates lipidiques chez les êtres vivants sont ainsi fondamentaux. Toutefois, les esters phosphoriques étant:

a) plus difficilement hydrolysables que les esters sulfuriques

b) que le transfert du radical phosphoryl est plus facile que celui du radical sulfuryl et selon les travaux de LIPMAN (F.) (103), tendent à démontrer que l'association:lipides soufrés/ lipides phosphorés dans les membranes par exemple est indispensable, cette laison assurant des transferts énergétique et électronique efficaces (VAN WAZEN) indispensables aux réactions biochimiques: en particulier celles impliquées dans des systèmes d'oxydo-réduction.

La carence en phosphore produit donc des troubles graves entraînant la mort. L'incidence de cette carence sur la biosynthèse des lipides polaires a été assez peu étudiée. Nous espèrons ici montrer cause et effet de cette carence en phosphore.

Les milieux de culture utilisés lors des carences en phosphore sont de deux types:

a) le premier est préparé, il comporte: eau distillée, sulfates, chlorures de sodium, potassium et magnésium en proportions proches de celles de l'eau de mer naturelle. Ce milieu ne contient pas d'ion phosphate , la présence de traces de phosphore est tout à fait négligeable.

Les effets de carence se manifestent nettement dans ce milieu artificiel; les résultats sont malheureusement difficiles à interpréter en raison, semble-t-il, d'effets secondaires dus à l'absence de certains ions dont la présence infinitésimale est cependant indispensable.

b) Le deuxième milieu utilisé est: eau de mer naturelle débarrassée au préalable des ions phosphates par passage sur millipore dans un premier temps pour éliminer les microorganismes planctoniques lesquels pourraient constituer d'importantes sources de phosphates. L'eau de mer filtrée est ensuite mise à barboter dans de l'eau de baryte, refiltrée et testée avant utilisation. On y ajoute selon les

cas: du chlorure de sodium et de potassium et du sulfate de magnesium en quantité suffisante.

Les thalles cultivés doivent bien sûr être soigneusement débarrassés des coquillages, incrustés dans le socle arraché avec les thalles lors des récoltes. Ces coquillages sont souvent de petites patelles riches en phosphates, en sulfates qui pourraient pallier aux déficienc en oligoéléments lors de nos expériences de carence.

La carence en phosphore se manifeste extérieurement par des symptômes très nets tels que: formation de taches orange le long des caules et sur les frondes. Celles-ci deviennent alors cassante Les thalles restés turgescents et de même couleur que les thalles normaux mais sont devenus très visqueux. Ces différents symptômes sont communs aux trois algues, seul le moment de leur apparition diffère.

Les dosages du phosphore total présent dans les thalles au cours de ces expériences de carence (tableaux XIV, XV, XVI, XVII) montrent qu'une diminution sensible de leurs valeurs apparait dès les huitième ou dixième jours de culture carencée. L'élimination du phosphore est très lente, comparée à celle du soufre. A partir du 20 ème jour de carence, une baisse très brutale se manifeste, accusant un changement profond du métabolisme du phosphore dans les thalles carencés.

. Chez Pelvetia canaliculata , la carence en phosphore est fatale au 38 ème jour de culture carencée. Auparavant, les incommodations physiologiques se manifestent dès les premiers quinze jours. Les réserves en phosphore de cette espèce, bien que faibles, sont suffisantes pour assurer une dépense minimale normale, les effets toxiques du manque paraissent endiguées efficacement. Après 20 jours, les diminutions sont de 2-3 % et après 35 jours, 20-25 %.

. L'analyse des lipides polaires totaux montre une chute de 1 % environ par rapport à la normale pendant les 15 premiers jours, puis de 4 à 6 % après 25 jours d'expérience. Ce chiffre se maintient jusqu'au 34 ou 36 ème jour pour tomber ensuite brutalement à 12 % en dessous dela normale avant la mort de la culture.

. Les lipides phosphorés totaux commencent à diminuer vers le 25 ème jour de carence de 2-3 % puis de 4-6 % après 30 jours. Entre 34-36 jours de carence en phosphore, les phospholipides se dégradent sensiblement: leurs formes lyso apparaissent pour la pre-

TABLEAU XVI

Effets de la carence en phosphore sur les variations des teneur et composition des lipides polaires des 3 Fucacées et en fonction du temps.

Espèces		Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux avec pigments polaires (											
		Pelvetia canaliculata				Fucus vesiculosus				Fucus serratus			
Lipides		T	I-7j	8-20j	20-30j	T	I-7j	8-20j	20-30j	T	I-7j	8-20	20-3
Série1	Gr1 X_I	I,00	I,04	I,06	I,06	I,50	I,5I	I,53	I,03	2,00	2,02	2,04	2,0
	Gr2 X_{I0}	2,I0	I,88	I,50	0,50	2,5I	2,53	2,56	2,55	2,0I	I,80	I,50	0,8
	Gr3 X_{I5}	2,02	2,00	I,97	0,92	I,50	I,47	I,49	I,02	I,50	I,38	I,56	I,2
Série2	Gr1 X_2	I,00	0,97	0,95	0,80	I,00	I,08	I,05	0,82	2,50	2,48	2,40	2,3
	X_3	I,50	I,45	I,38	I,30	2,02	I,96	I,90	I,28	2,00	I,98	I,94	I,8
	X_4	2,00	2,04	2,08	2,08	I,50	I,48	I,46	I,02	I,50	I,52	I,53	I,5
	X_5	2,68	2,72	2,74	2,73	3,00	3,09	3,07	2,58	3,5I	3,53	3,52	2,9
	Gr2 X_6	2,05	2,04	I,97	I,90	3,34	3,32	3,25	2,80	I,00	0,95	0,92	0,8
	X_7	3,07	3,06	2,60	2,45	5,59	5,55	4,35	2,70	I,53	I,50	I,5I	I,4
	X_8	5,04	5,02	4,90	4,0I	6,6I	6,52	6,56	5,92	2,54	2,50	2,40	2,3
	X_9	2,50	2,05	I,90	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	I6,05	I6,00	I5,89	I2,2
	Gr3 X_{II}	2,45	2,48	2,05	I,75	2,47	2,52	2,5I	2,45	I,50	I,53	I,54	I,4
	X_{II}	2,98	3,02	2,72	I,80	4,79	4,82	4,80	4,50	I,00	I,00	I,08	0,9
	X_{I2}	I9,3	I9,45	I9,4	I8,95	I3,25	I3,30	I3,28	I2,I0	2,0I	2,08	2,I0	I,4
	X_{I3}	2,98	3,I5	3,02	3,0I	I,00	0,80	0,I5	0,I0	I0,02	I0,08	I0,I2	9,7
	X_{I4}	2,00	2,I2	2,06	2,03	I,00	I,02	0,85	0,27	2,50	2,42	2,28	2,I
LP_T/I00g L_T.		I9,8	I9,7	I9,0	I6,50	22,30	22,0	2I,0	I9,0	25,85	25,9	24,0	22,
SL_T/I00g LP_T		3I,52	3I,68	3I,66	28,90	24,08	25,0	24,9	20,0	I8,53	I9,0	I9,2	I5,
PL_T/I00g LP_T		22,94	22,00	2I,40	20,00	27,I7	27,0	24,8	22,5	34,59	33,5	30,5	28,
Polysaccharides sulfates		I8,00	I8,20	I8,25	I6,78	I6,50	I6,48	I6,7	I5,4	I4,50	I4,60	I4,I0	I2,
Protéines solubles.		0,82	0,82	0,83	0,8I	0,83	0,82	0,84	0,84	0,84	0,86	0,87	0,8
Polysaccharides phosphate		I4,00	I2,80	I2,00	II,00	I4,50	I4,00	I3,0	II,00	I5,50	I4,50	I2,70	II,
Phosphate non lipidique.		0,7I	0,70	0,70	0,65	0,72	0,72	0,7	0,68	0,74	0,70	0,69	0,6
AGS/AGIS LP_T		0,40	0,39	0,38	0,37	0,36	0,35	0,35	0,34	0,33	0,28	0,30	0,3
AGS/AGIS Gr1		0,40	0,37	0,36	0,37	0,34	0,34	0,34	0,35	0,36	0,34	0,35	0,3
AGS/AGIS Gr2		0,39	0,37	0,37	0,36	0,35	0,33	0,32	0,34	0,35	0,32	0,32	0,3
AGS/AGIS Gr3		0,39	0,35	0,36	0,35	0,34	0,26	0,32	0,33	0,38	0,27	0,29	0,3

Nota. T = Témoins non carencés en phosphore, éclairé en lumière artificielle complè

TABLEAU XVII

Variations des teneur et composition en lipides polaires en fonction du temps et des différentes lumières chez les thalles carencés en phosphores pendant 7j et chez les thalles non carencés des trois Fucacées choisies.

Poids par 100 grammes de lipides polaires totaux avec écarts moléraux(±p)

ées	Pelvetia canaliculata						Fucus vesiculosus						Fucus serratus					
	LA		GLOD		PLOD		LA		GLOD		PLOD		LA		GLOD		PLOD	
ies	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C	T_{NC}	T_C
	I	I,04	I,04	I,02	I	I	I,5	I,5I	I,55	I,52	I,53	I,48	2	2,02	2,0I	2	2	I,8
IO	2,I	I,88	2,I6	2,20	2,08	2,04	2,5I	2,53	2,60	2,54	2,56	2,50	2,0I	I,90	2,03	2	2	I,92
I5	2,02	2	2,05	2,I0	2,04	2,08	I,50	I,47	I,50	I,53	I,47	I,49	I,50	I,30	I,52	I,54	I,50	I,60
2	I	0,97	0,97	0,90	I	0,93	I	I,08	I,0I	0,96	I	0,96	2,50	2,48	2,55	2,50	2,50	2,42
3	I,50	I,45	I,46	I,36	I,50	I,40	2,02	I,96	2,03	2	2,04	I,98	2	I,98	2,03	2	2,05	2
4	2	2,04	I,95	I,90	2,0I	I,90	I,50	I,48	I,49	I,40	I,52	I,40	I,50	I,52	I,53	I,48	I,55	I,42
5	2,68	2,72	2,62	2,54	2,76	2,70	3	3,09	2,97	2,50	3,04	2,80	3,5I	3,53	3,57	3,49	3,50	3,35
6	2,05	2,04	2,04	2,03	I,87	I,83	3,34	3,32	3,3I	3,30	3,30	3,27	I	0,99	0,93	0,94	0,90	0,89
7	3,07	3,05	3,02	3	2,78	2,74	5,59	5,55	5,47	5,45	5,49	5,46	I,53	I,50	I,53	I,5I	I,48	I,45
8	5,04	5,02	5,05	5,06	4,60	4,57	6,6I	6,52	6,54	6,52	6,47	6,44	2,54	2,50	2,52	2,50	2,47	2,42
9	2,50	2,05	2,42	2,28	2,56	2,48	0,0I	0	0,02	0	0,03	0	I6,05	I6	I5,9	I5,2	I6,5	I6,3
II	2,45	2,47	3,5I	3,52	2,47	2,42	2,47	2,52	2,52	2,54	2,25	2,26	I,50	I,53	I,86	I,98	I,47	I,49
II'	2,98	3,02	2,9I	2,92	2,95	2,96	4,79	4,82	5,05	5,08	4,55	4,53	I	I	I,92	I,94	I	I,05
I2	I9,3	I9,4	2I	2I,03	I9,45	I9,4	I3,25	I3,3	I4,25	I4,3	I2,8	I2,7	2,0I	2,03	1,94	1,98	I,97	I,99
I3	2,98	3,I5	2,90	2,88	3,I0	3,42	I	0,80	0,93	0,89	I,04	I,42	I0,02	I0,I	9,90	9,86	I0,I2	I0,98
I4	2	2,I2	I,92	I,90	2,05	2,25	I	I,02	0,94	0,90	I,05	I,I8	2,50	2,42	2,48	2,40	2,54	2,70
L_T	3I,5	3I,7	32,8	34,4	32,4	32,6	24,08	25	26,4	26,43	23,2	23,6	I8,5	I9	I3,6	I8,66	I3,34	I9,02
L_T	22,9	22	22,7	22,07	22,9	2I,7	27,I7	27	26,5	26,20	26,98	26,3	34,6	33,5	33,5	33,40	32,38	3I,88
L_T	I9,8	I9,7	I9,8	I9,I0	I9,7	I9,4	22,3	22	22,3	22,I8	22	2I,8	25,0	25,9	24,3	24	25,5	24,20
sac ide phate	I4	I2,8	I3	II,8	I3	I0	I4,5	I4	I4	I2	I4,2	I0	I5,5	I4,5	I4,6	I3,8	I4,6	II,2
es phaté	3	2,I0	2,95	2,I2	2,96	2,05	3,40	3	3	2,50	3,05	2,50	3,20	3,05	2,I0	2,80	3,I3	2,70
n li- que.	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,72	0,72	0,72	0,70	0,73	0,73	0,74	0,70	0,70	0,70	0,7I	0,70
sac- ides ates	I8	I8,2	I8,4	I8,6	I8,2	I8,6	I6,5	I6,7	I6,7	I6,8	I6,6	I6,8	I6,5	I4,6	I4,2	I4,8	I4,5	I4,9
éines rées	0,82	0,8	0,8	0,82	0,82	0,83	0,83	0,82	0,83	0,83	0,82	0,82	0,84	0,86	0,84	0,82	0,85	0,84
es ates.	2,80	2,84	2,8I	2,84	2,80	2,85	2,70	2,72	2,7I	2,73	2,72	2,74	2,66	2,65	2,70	2,72	2,7I	2,75

Nota LA,GLOD,PLOD = lumière artificielle,lumière à grande longueur d'onde dominante et à petite longueur d'onde dominante- T_{NC-C} = Thalles non carencés et carencés

mière fois évalués aux taux de 8-10 % des lipides polaires totaux.

. X_6, X_7, X_8 les premiers perdent 2-4 % pendant les 20 premiers jours de carence, puis 6-7 % au 10 ème jour et se maintiennent jusqu'à la mort de la culture. X_2, X_3 augmentent de 3 %, baissent ensuite de 1 % pendant 2 ou 3 jours et se maintiennent à 2% au dessus de la normale jusqu'à la fin de l'expérience. X_1, X_5, X_4 gagnent progressivement pendant les 25 premiers jours et se stabilisent à 6 %,au dessus de la normale, à partir du 30 ème jour de carence et jusqu'à la mort des thalles.

Les teneurs en X_9 et X_{10} perdent de 15 - 16 % environ entre les 20 ème et 30 ème jour de carence, et, à la veille de la mort des thalles, on n'en trouve plus que des traces.

. Les sulfolipides totaux ont faiblement augmenté pendant les dix premiers jours de carence, environ de 1 à 2 % de la teneur normale, puis de 4-5 % entre les 15-30 èmes jours de carence. Les teneurs en X_{13}, X_{14} ont augmenté vers le 15 ème jour de carence effective de 2-3 % environ puis de 3-4 % au 20 ème jour d'expérience; elles restent inchangées au taux d'environ 3 % supérieur au taux normal jusqu'à la mort de la culture. Les valeurs de X_{11} et X_{12} ont augmenté de 2-3 % entre les 20 ème et 30 ème jours de carence et au 35 ème jour de culture, elles baissent brutalement, tombant à 12% en dessous de la normale, précédant les dégradations massives de la plupart des lipides polaires.

Les acides gras constitutifs des lipides polaires tendent vers une saturation potentielle sensiblement égale à celle des témoins. Le rapport AGS/AGIS est de l'ordre de 0,38 contre 0,39 normalement.

. Chez Fucus vesiculosus , l'action d'une carence en phosphore est plus ambigüe; tous les symptômes décrits ci-dessus se manifestent, mais apparaissent plus tardivement que chez Pelvetia canaliculata.

L'analyse des lipides polaires totaux accuse une baisse régulière des teneurs (tableau XIV, XV, XVI, XVII) qui débute avec 1-2% au 20 ème jour de carence, puis atteint 4 % après le 35 ème jour d'expérience et jusqu'à la mort de la culture.

Les lipides phosphorés totaux ont augmenté paradoxalement durant les 5 premiers jours de carence alors que les quantités en phosphore total ont faiblement baissé ensuite, à partir du 10 ème jour de carence, ces quantités de phospholipides totaux diminuent, attei-

gnant 6 % en dessous des valeurs normales vers le 30 ème jour d'expérience. Au bout du 40 ème jour de carence, les phospholipides totaux ont diminué de 20 % subitement en trois jours, alors la mort des thalles survient rapidement. Les valeurs en X_1, X_5, X_2 qui ont augmenté progressivement entre les 10 ème et 25 ème jours de carence de 2-4 %, se stabilisent ensuite à 3 % en dessus de la normale du 30 ème au 40 ème jours de carence pour se réduire brusquement au 1/3 de leurs quantités initiales indiquant ainsi le début de la dégradation de la quasi totalité des lipides polaires. Les valeurs X_3, X_4, X_6, X_7, X_8 qui s'abaissent entre les 20 ème et 30 ème jours de carence d'environ 3 à 5 % au début, se stabilisent à 6% vers le 35 ème jour. Les X_9, après stabilisation à 3 % en dessous de la normale, diminuent à nouveau très vite atteignant 12 % en dessous de la normale à la veille de la mort de la culture.Les sulfolipides totaux ont augmenté sensiblement pendant les 5 premiers jours de carence, leur taux atteignant 8-10 % au dessus de la normale, mais à partir du 12 ème jour une diminution s'amorce, entre les 25 ème et 34 ème jours, a teneur en sulfolipides totaux est de l'ordre de 6 % en dessous de la normale. Parmi les sulfolipides remaniés durant la première période entre les 5 ème et 10 ème jours de carence, ce sont surtout les fraction X_{14} et X_{15} qui diminuent de 2-3%. Entre les 12 ème et 25 ème jours elles gagnent 2 % de plus que les valeurs témoins. X_{13} et X_{12} ont augmenté pendant ces périodes de 3 % environ mais seulement à partir du 8 ème jour de carence et jusqu'au 34 ème jour de l'expérience, sont restés inchangés. Les dégradations des premiers sulfolipides ont lieu 24 h. avant la mort de la culture. Les acides gras constitutifs des lipides polaires tendent, mais faiblement vers une saturation potentielle. Le rapport des AGS/AGIS est de l'ordre de 0,30-0,31 contre 0,26 pour les algues non carencées.

Conclusions

Une carence en phosphore se répercute donc très nettement par des variations des teneur et composition en lipides polaires tout particulièrement sur la biosynthèse des lipides phosphorés totaux. Les lipides soufrés par contre coup varient aussi qualitativement et quantitativement. Dans l'ensemble des cas, nous avons noté , comme pour la carence en soufre, une augmentation de la teneur en sulfolipides, mais, en général, cette augmentation est de faible amplitude. Durant la carence en phosphore,ce sont les polyesters sulfates qui assurent l'ensemble des fonctions chloroplastiques alors que les

polyesters sulfates et phosphates se partagent ces fonctions sous des lumières riches en grande longueur d onde. De plus ces polyesters sulfates et phosphates assument dans ces conditions leur rôle dans l'assimilation photosynthétique sous des lumières riches en courtes longueurs d'onde. Or seuls les monoesters sulfates et phosphates sont fonctionnels dans des conditions normales de culture et ceci quelle que soit l'espèce expérimentée.

. La carence en phosphore est mal supportée par F. serratus, et P. canaliculata et F. vesiculosus au contraire sont plus aptes à la survie dans ce cas. L'inverse s'est produit dans le cas d'une carence en soufre.

Quant aux glucides, protides, lipides des algues carencées en phosphore, nous avons observé:

1) Stimulation de la synthèse des lipides soufrés dans leur ensemble;

2) Mobilisation des phosphates polysaccharidiques des parois et diminution rapide de leur teneur dès e début de la carence. Si ce taux baisse au delà d'une certaine valeur: une chute brutale est alors enregistrée préludant à l'hémorragie des esters phosphates. A partir de ce moment là: les teneurs des lipides phosphorés totaux diminuent rapidement en particulier celles des monoesters du groupe 2 qui se sont longtemps maintenus à une valeur quasi normale après la mise en carence des algues. Cette baisse de la teneur des esters phosphates des lipides du groupe 2 entraîne, par répercussion, la baisse brutale des teneurs en sulfolipides et leur dégradation généralisée.

3) Hémorragie des esters phosphates et perte de la capacité d'assimilation des phosphates même si ces derniers sont fournis à des algues carencées, leur absoprtion est nulle et leur fuite hors des thalle continue.

4) Baisse de la teneur en protéines soufrées et élimination de ces derniers dans le milieu.

5) Taux en phosphates intracellulaires, non lipidiques, fortement réduit, ces valeurs tombent au 1/5 de leur valeur initiale, entre les 22 ème et 28 ème jours de carence. Il faut ajouter que la carence en phosphore favorise encore une accumulation importante des mono-, di et triesters sulfates glucidiques intracellulaires dans les thalles carencés. Ces esters sulfates ne proviennent pas des sulfates polysaccharidiques des parois. Il semble que la carence en phosphore

prive les thalles de leur capacité de "bruler" les esters sulfates glucidiques. La biosynthèse des coenzymes phosphates tels que les ATP, ADP ... étant perturb , le potentiel de production de ces substances est réduit sinon désorganisé. La répercussion sur le métabolisme des sucres sulfatés est inévitable: le transfert des sulfates ne peut avoir lieu normalement et dans ces conditions, leur accumulation est une conséquences directe. Tous ces phénomènes ont été observés chez les trois espèces étudiées indifféremment.

Enfin, signalons pour terminer que la carence simultanée en soufre et en phosphore provoque la mort des cultures quasi instantanément dès le 5 ème jour et cela quelle que soit l'espèce alors que la survie peut atteindre de 30 à 40 jours dans des expériences séparées de carence en soufre ou en phosphore.

IV) Application d'une technique de marquage par des radioéléments. Etude des variations des teneur et composition en lipides polaires chez les trois algues choisies.

Toutes les expériences de culture précédentes, ont été faites par alimentation en sulfates et phosphates suivant des conditions précises. Les crampons sont ainsi seuls en contact avec le milieu nutritif. Le transfert se fait par la voie ascendante dans la plante. Diverses formes de soufre et de phosphore ont été essayées dans le milieu nutritif à titre expérimental; nous avons observé ainsi que sulfates et phosphates minéraux ou organiques sont directement assimilés par les 3 algues. Les sulfates et phosphates sont indispensables pour un développement normal des thalles. Les formes réduites du soufre telles que: sulfures, sulfites, sulfhydriles.... sont très mal assimilées par les algues en temps normal; à forte concentration elles sont même toxiques . Mais s'il y a carence ou déficience en sulfates, les formes réduites peuvent être absorbées par les thalles carencés, mais toujours en très faibles quantités. Si l'apport en sulfures, sulfites et sulfydriles , lors des carences , est assuré par les frondes, leur suppléance (aux sulfates) est plus efficace Les signes de carence peuvent même disparaître peu à peu à condition que la période de carence en soufre ne dépasse pas 10-15 jours, c'est-à-dire que la teneur en polyesters sulfates lipides des thallesn'ait pas été profondément perturbée. Le soufre moléculaire ne peut être absorbé par aucune des trois espèces. Il devient même toxique si sa

concentration dans le milieu de culture dépasse 1 Mole/litre.

Pour le phosphore, nous avons aussi constaté que les phosphates minéraux: ortho, para, méta et pyro sont tous directement assimilables. Les phosphates semi-organiques le sont aussi mais en cas d'appauvrissement du milieu en sulfates minéraux seulement. Les phosphates organiques pénètrent aussi dans les trois algues. Elles les absorbent même préférentiellement aux phosphates minéraux, les deux étant présents simultanément dans le milieu de culture. Dans le cas d'une carence avancée, les phosphates organiques sont plus efficaces pour faire repartir les cultures; néanmoins cet apport doit se faire progressivement sinon ces phosphates deviennent toxiques tout particulièrement aux algues carencées depuis plus de 15-20 jours.

Les esters de l'acide phosphoreux et les dérivés organométalliques tels que les phosphines I, II et III aires sont franchement toxiques même à faible dose. Elles ne peuvent être utilisées même à l'état de trace.

La destinée des sulfates et phosphates à l'intérieur des cellules,pour de nombreux auteurs (104-105) étudiant leur absorption élémentaire chez les végétaux supérieurs,semble liée au fait que soufre et phosphore sont des éléments peu mobiles et que leur migration d'une zone à l'autre est rare. D'autres auteurs (106-110) ont au contraire constaté une certaine migration lors d'une carence alimentaire en phosphore et en soufre: ils expliquent la relative mobilité en cas d'extrême nécessité. Ces hypothèses sont revisables car ces auteurs n'ont pas tenu compte du facteur "vieillisement" des molécules dont l'importance est aussi capitale en biologie moléculaire qu'en physiologie. En effet, la variation perpétuelle de l'entropie des molécules dans la cellule ne peut nullement favoriser la fixation, même temporaire, de ces molécules , sans affecter tant soit peu leur capacité équipotentielle de réactivité chimique. Celle-ci, caractéristique, sert lors de la mobilisation et du métabolisme de chaque molécule.

La méthode de marquage employée au cours de ce travail permet: de suivre l'évolution et des sulfates et phosphates, dès leur absorption et jusqu'à leur élimination définitive des thalles, mettant en évidence la mobilité des sulfates et phosphates tout en soulignant les filiations:des glucides, des protides et des lipides soufrés et phosphorés au cours de leurs voies de biosynthèse.

Méthodes d'études

Les algues récoltées sont débarrassées ici encore des coquillages accrochés au socle soutenant les crampons, afin d'éliminer au maximum les sources étrangères possibles en sulfates et phosphates. Les crampons sont seuls mis en contact direct avec le milieu expérimental et nutritif, la partie supérieure des thalles étant maintenue hors de ce milieu pendant toute la durée de l'expérience. Le milieu est constitué par l'eau de mer désulfatée ou déphosphatée selon les méthodes exposées au chapitre précédent. Ce milieu contient,en outre, des entraîneurs sulfates et phosphates pour certaines expériences au taux 0,2 Mole/litre, en plus d'éléments marqués (environ 1 mC/litre d'eau de mer). Les durées de marquage sont échelonnées entre 20" et 30'. Après chaque marquage, les thalles sont rincés à l'eau de mer d désulfatée et dephosphatée afin d'éliminer les traces de S* et P* non absorbé s puis congelés à - 10°C pendant 20' après passage durant 1' dans de l'azote liquide afin d'arrêter les transports de métabolites à l'intérieur des thalles. Une partie du lot, destinée à l'étude cinétique de l'absorption et du transport des radioéléments, sera découpée en Fragments de 1 cm de longueur, sur toute la largeur de la fronde à partir des crampons. Ces fragments sont directement introduits dans des piluliers en plastique contenant 10 ml de scintillateur liquide "INSTAGEL PACKARD LIQUID". Les radioéléments sont dosés au scintillateur PACKARD. L'autre partie des thalles marqués est lyophylisée sous vide et réduite en poudre. Les lipides, protides et glucides sont extraits séparément selon les méthodes préconisées ci-dessus et analysés qualitativement et quantitativement. Les substances marquées sont dosées après chromatographie sur couches minces (de silice/silicate de magnésium sur support en plastique) ou par chromatographie ascendante et descendante sur papier WHATMAN 3M selon des techniques déjà décrites. Les comptages sont faits directement sur les chromatogrammes par l'intermédiaire de l'appareil "PACKARD RADIOCHROMATOGRAPHY SCANNER" modèle 7200.

Résultats

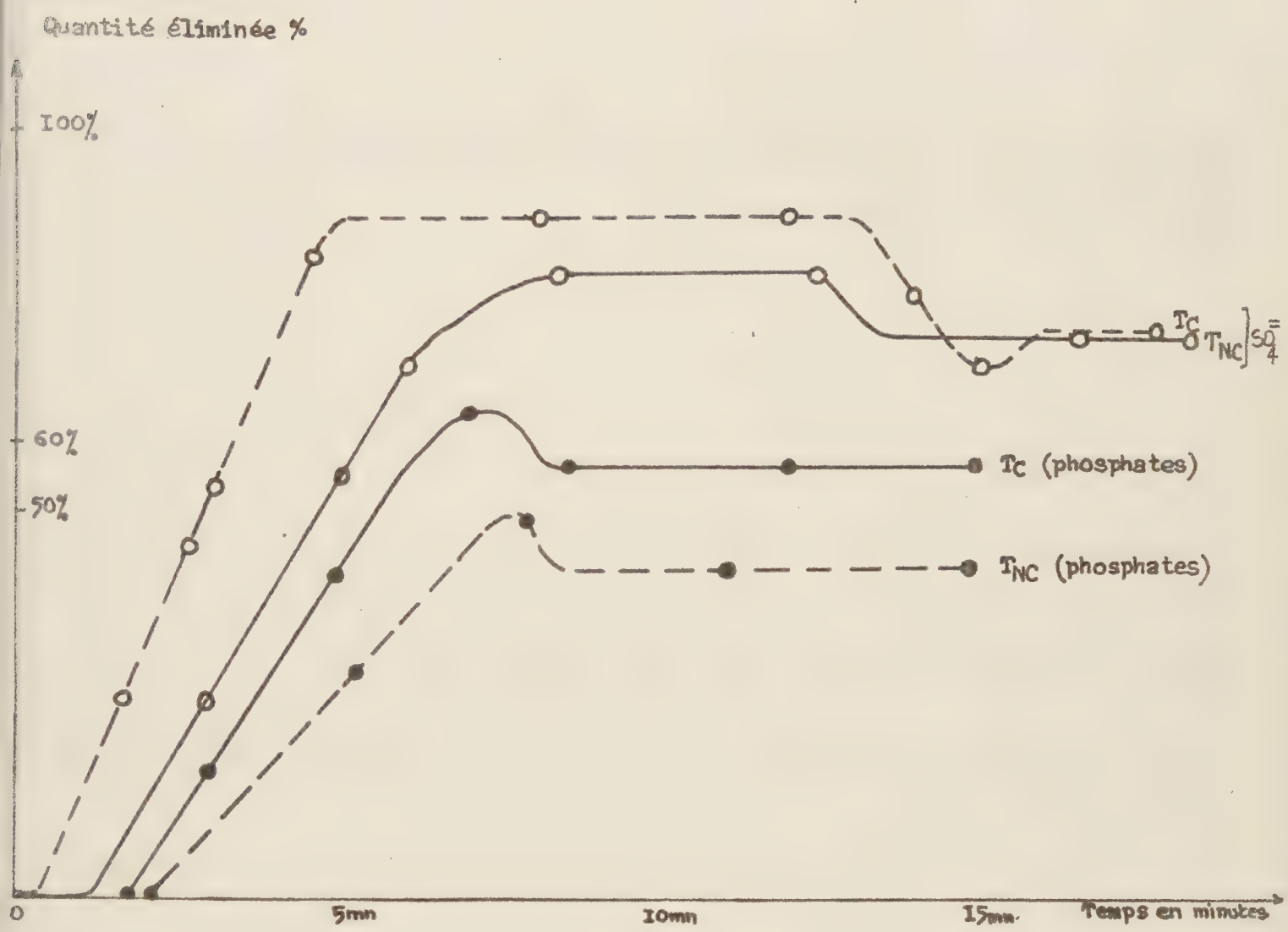
I) Absorption

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux XIII, XIV, XV, XVI et illustrés par les courbes cinétiques 11 et 12. Il résulte de ces expériences:

a) Les thalles non carencés absorbent les éléments marqués après

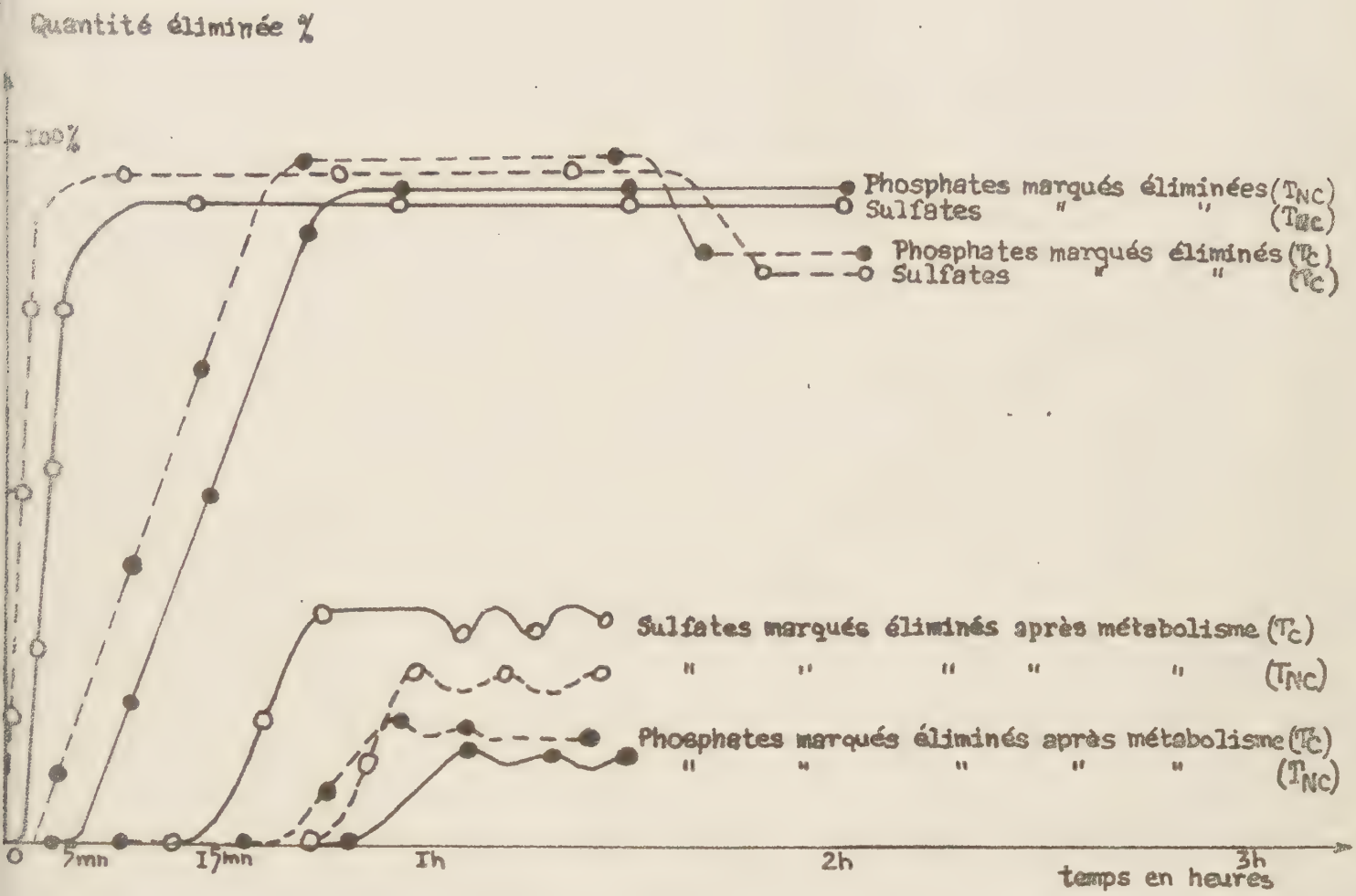
COURBE IO

Sulfates et phosphates absorbés en fonction du temps.



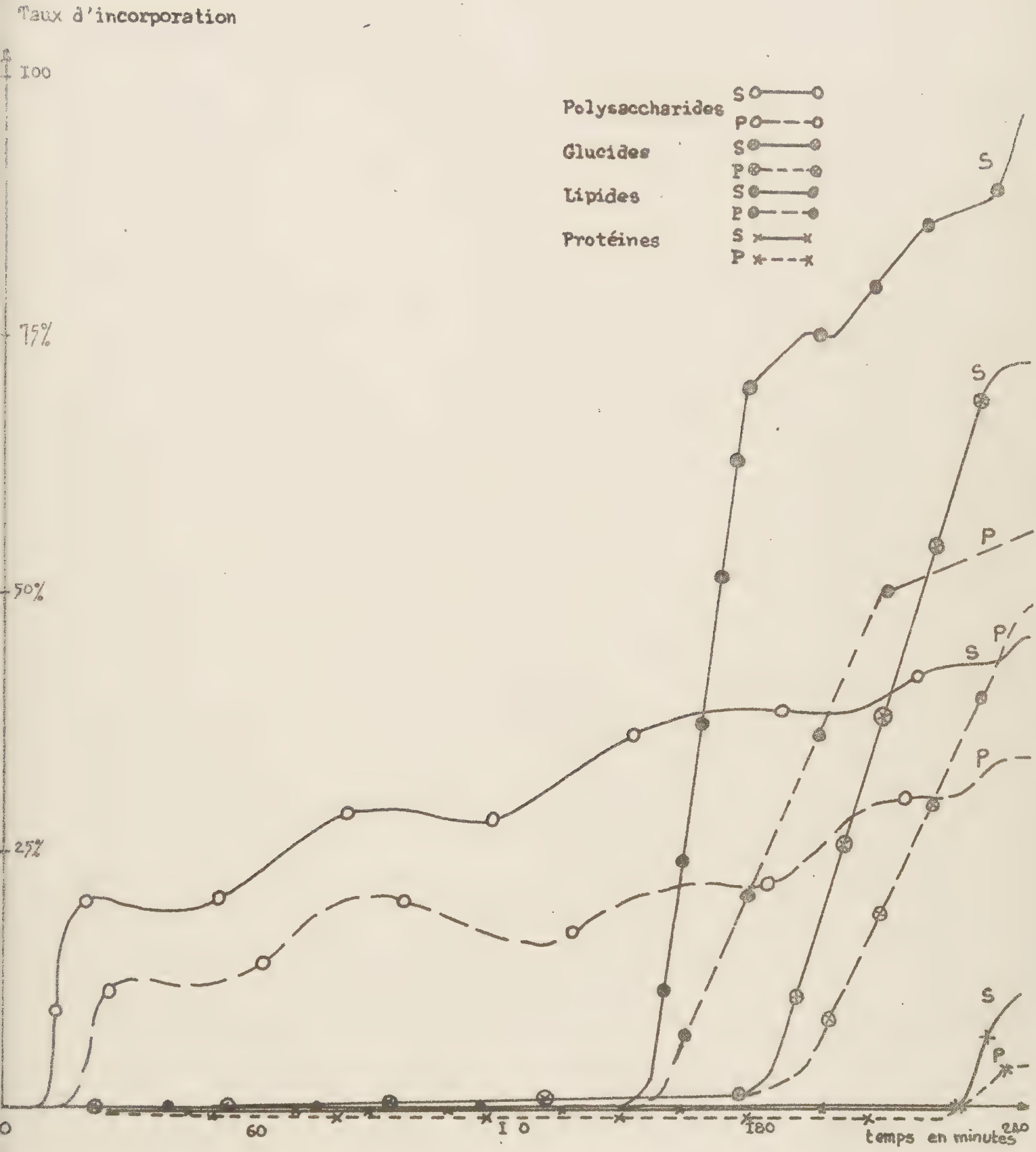
COURBE II

Elimination des sulfates et phosphates marqués
après absorption et après incorporation dans
les diverses substances sulfatées et phosphatées



COURBE I2

Incorporation des sulfates et phosphates marqués
dans les diverses substances en fonction du temps



une courte phase obscure au cours de laquelle aucun radioélément ne pénètre dans les thalles. Cette période obscure dure 4-5" quelle que soit l'espèce, mais elle est sujette à des variations en fonction de l'éclairage employé, de la température ambiante et surtout de l'état physiologique des thalles. Pour les thalles carencés cette absorption est immédiate et massive. La période "obscure" est presque inexistante. Mais si l'absorption est massive, le taux d'incorporation du soufre et du phosphore marqués dans les diverses substances est relativement bas, surtout au début de l'expérience.

b) L'absorption est continue mais quantitativement limitée. Après 24 h de mise en présence avec les radioéléments, le seuil maximum est atteint etles taux en soufre et en phosphore marqués absorbés se maintiennent constants à la condition que la température ne varie pas, que l'activité physiologique des thalles soit restée normale.

2) Transport-Incorporations dans les divers métabolites.

Concernant la cinétique des transports et d'incorporation des radioéléments dans divers métabolites , nous avons noté certains faits essentiels, à savoir:

a) L'acheminement des radioéléments se fait tout d'abord par la région médiane des frondes, puis radialement vers les zones périphériques. Les dosages de radioéléments montrent un acheminement presque immédiat dès l'absorption des crampons à l'extrémité opposée de la fronde. En effet, entre 20" et 25", suivant la hauteur des thalles, les quantités de radio éléments sont sensiblement équivalentes tout au long de la zone médiane des frondes; la vitesse de transport est de l'ordre de 30 à 35 cm/mn, pour les thalles non carencés, et 50-60 cm/mn pour les htalles carencés.[b] [b]Les radioéléments absorbés mais non incorporés sont éliminés au niveau des frondes et des crampons à la fois, environ une minute après leur absorption. La différence entre les quantités absorbées et les quantités rejetées est faible , représentant le centième de la quantité absorbée au départ. La durée qui sépare l'absorption etle rejet des radioéléments est de l'ordre de une minute.

c) L'incorporation des radioéléments est tardive et se fait par étapes successives. En effet, cinq à dix minutes après l'absorption au niveau des crampons, les sulfates et phosphates sont incorporés dans les polysaccharides des parois. Mais la quantité des radioéléments présents est faible; elle représente environ 1/30 ème de la

quantité totale des soufre et phosphore totaux des polysaccharides pariétaux. Cette quantité augmente progressivement en fonction du temps. Si l'apport en radioéléments est régulier, les polysaccharides soufrés et phosphorés seront totalement marqués vers les 90-92 heure. Les glucides intracellulaires eux sont marqués 3 h environ après l'absorption et les taux en S* et P* augmentent progressivement et continuellement durant 6-12 heures. Par rapport aux glucides totaux présents , la quantité de glucides marqués ne peut dépasser le seuil de 65 % des glucides totaux quelles que soient les quantités fournies de sulfates et phosphates marqués. Ce pourcentage maximum,maintenu constant durant toute la durée de l'expérience, ne peut être attribué à l'immobilisation temporaire des soufre et sulfate dans les glucides intracellulaires; car si on arrête l'apport des radioéléments, la teneur en sucres marqués diminue peu à peu. La teneur en soufre et en sulfates totaux (non marqués + marqués) reste constante. L'hypothèse d'un renouvellement permanent des substances est donc la plus probable, compte tenu de ces observations. Entre l'incorporation des sulfates et phosphates marqués dans les polysaccharides pariétaux et dans les glucides intracellulaires un délai de 20 à 25 minutes est nécessaire. Ce temps est nécessaire à la mobilisation des métabolites de remplacement au cours du cycle métabolique intracellulaire par exemple des glucides. De plus, nous constatons que si les premiers produits marqués dégradés ne sont pas éliminés, l'incorporation des sulfates et phosphates marqués n'a pas lieu dans les glucides intracellulaires alors que l'intégration des S* et P* continue dans les polysaccharides pariétaux. La teneur en sulfates et phosphates marqués est toujours proportionnelle à la quantité de substances marquées éliminées. Sur la courbe cinétique d'incorporation des sulfates et phosphates marqués dans les glucides intracellulaires, ce délai est traduit par une période"obscure" au cours de laquelle aucun radioélément n'est incorporé. Cette période "obscure" peut être plus ou moins longue suivant l'activité physiologique des thalles, au cours de l'expérience. Elle dépend, entre autres, des intensités lumineuses, de la qualité des lumières employées et surtout du degré de déficience: en soufre, en phosphore des algues au moment de l'expérience. Pour les algues carencées, l'incorporation des sulfates et phosphates marqués est quasi instantanée et la période "obscure" est plus réduite, le seuil d'incorporation est très vite atteint. Par contre le chargement des polysaccharides est plus long mais le délai qui -

sépare l'incorporation des produits marqués dans les polysaccharides pariétaux d'une part et dans les glucides intracellulairesd'autre part est presque nul.

Si l'incorporation des radioéléments dans les polysaccharides pariétaux et dans les glucides intracellulaires est assez rapide, l'intégration des S * et P * dans les lipides demande un délai plus ou moins long, comparativement. Les premiers lipides marqués apparaissent une heure environ après l'absorption des sulfates et des phosphates par les crampons, et les teneurs en sulfates et phophates marqués des lipides polaires augmentent graduellement mais le chargement n'est pas limité comme dans le cas des glucides intracellulaires, l'incorporation peut être totale. Quant aux lipides soufrés: X_{15} et X_{14} sont marqués tout d'abord : 65 minutes environ après la pénétration mais leurs taux augmentent lentement atteignant un seuil fixe si les radioéléments sont fournis en abondance et sans entraîneur pendant huit jours. X_{13}, X_{12}, X_{11}, X_{11},commencent à être marqués 1 à 12 heures après absorption et leur chargement est relativement rapide et total après 80 h. En effet, tous ces sulfolipides sont marqués pour 80 % %, après 24 heures et la vitesse d'incorporation des radioéléments peut être accélérée notablement si on augmen l'intensité des éclairages au cours des expériences . L'ordre d'apparition des sulfolipides marqués et la vitesse d'incorporation dépendent des espèces, ce qui confirme le rôle plus ou moins prépondérant de chacun de ces lipides soufrés pour chaque espèce.

Chez Pelvetia canaliculata X_{15} et X_{14} sont toujours les premiers radioactivés, puis X_{12}, X_{11}, X_{11}. Les X_{13} sont marqués en dernier. Mais si les éclairages employés sont filtrés et riches en lumières de courtes longueur d'onde (275 à 400 nm par exemple), X_{13} sont très vite marqués et leur taux est maximum au bout de 4-5 heures. De même si les cultures ont lieu dans l'obscurité permanente, le marquage des X_{13} est rapide et atteint la valeur maximale au bout de 2 à 3 heures: alors que dans ces deux cas particuliers, chez P. canaliculata, X_{12}, X_{11}, X_{11},sont marqués plus tardivement et de façon limitative . Tout ceci confirme une fois de plus que les glycosylpolysulfates esters lipides sont des sulfolipides fonctionnels des algues de profondeur et sont prépondérants dans le cas des éclairages pauvres en lumières de grandes longueurs d'onde quelle que soit l'espèce. Les glycosyl monosulfates esters lipides sont de ce fait des sulfolipides prépondérants des algues de surface et ils sont surtout fonctionnels en présence des lumières de courtes longueurs

d'onde.

Chez F. vesiculosus , le marquage des lipides soufrés se fait suivant le même ordre que pour les lipides de P. canaliculata; seuls les délais d'incorporation sont plus longs.

Chez F. serratus, nous avons aussi noté le marquage d'abord des sulfates dans les polysaccharides des parois puis des glucides intracellulaires et enfin des sulfolipides. Neanmoins, par rapport aux P. canaliculata et F. vesiculosus, il y a des différences essentielles. Tout d'abord pour les glucides intracellulaires, la plupart sont des tri- et même des tetraesters sulfates tandis que chez P. canaliculata et F. vesiculosus, les mono- et diesters sulfates sont dominants.

De plus,les écarts entre les temps d'incorporation des sulfates marqués d'une part dans les polysaccharides, d'autre part dans les glucides intracellulaires sont relativement courts. Ces écarts sont de 10 à 15 minutes chez F. serratus alors que chez P. canaliculata et Fucus vesiculosus , ils sont de 25 ' à 30 '. Les X_{15} et les X_{14} sont les premiers sulfolipides marqués chez F. serratus; ils se forment une demi-heure environ après l'absorption des radioéléments. Les X_{13} et X_{12} sont marqués en second, au bout d'une heure et après 56 heures, 80% de ces lipides sont marqués. Les X_{11} sont très faiblement marqués pendant les trois premières heures qui suivent l'absorption des radiosulfates et le taux d'incorporation de ces lipides est limité ne depassant pas le 1/10 des sulfates totaux de ces sulfolipides.

Concernant les phosphates marqués, nous avons noté des incorporations successives dans le même ordre chronologique. Comparativement aux incorporations des radiosulfates, les délais d'incorporation des phosphates marqués sont relativement plus longs et leur élimination est très lente. Les polysaccharides des parois sont marqués entre 20 et 30 minutes après l'absorption des phosphates marqués au niveau des crampons. Les glucides intracellulaires ne sont marqués qu'au bout de 5 heures. Les lipides sont ensuite marqués dans les 3-4 jours suivants l'incorporation des phosphates marqués dans les glucides. Leur incorporation est lente , régulière et totale, tandis que la période "obscure" est particulièrement longue. Toutefois, au niveau de l'espèce, cette période "obscure" est très variable. Chez P. canaliculata et F. vesiculosus , cette période obscure est de l'ordre de 75 heures; chez F. serratus, elle est plus réduite, soit de 50 heures environ. Les X_{10}, X_9 et X_8 sont les premiers marqués mais le taux des

marquages plafonne, le maximum est très vite atteint dès que l'incorporation des phosphates marqués a commencé. Les X_6, X_3, X_4 , X_7, X_5 sont marqués ensuite soit 30 à 45 ' après le début des marquages des X_{10}; X_9, X_8. Les X_1 apparaissent en dernier et deux heures parès leur marquage, les premiers produits métabolisés contenant des radiophosphates sont éliminés dans le milieu de culture, soit 5 heures après le marquage des premiers phospholipides.

Toutefois, les taux des substances marquées éliminées restent faibles comparés aux quantités de radiophosphates incorporés. Dans les protéines marquées, les incorporations de radiosulfates et phosphates ont lieu très tardivement. Chez les trois espèces, les protéines sont marquées en 50 à 60 heures par les radiosulfates; les nucléoprotéines par le phosphoreen 75-85 heures.

Si les talles sont soumis aux carences en soufre et en phosphore,après trois jours de marquage, la teneur en radioéléments des polysaccharides pariétaux diminue d'abord vite, puis très lente ment; mais au bout de 74 heures, il n'existe plus de trace de radioéléments. Les glucides intracellulaires perdent aussi très rapidement leur radioactivité, comme et aussi vite que les polysaccharides. Les lipides par contre sont restés marqués assez longtemps, surtout les lipides minoritaires. Les lipides majoritaires, après une chute notable durant les 50 premières heures, maintiennent alors le taux de radioactivité acquis. Les minoritaires, au contraire, chutent par légers à coup mais les lipides, 15 jours après le début de la période de carence restent marqués pour 3% de leur valeur initiale. Les protéines restées longtemps marquées accusent une diminution consécutivement à la perte en radioéléments des lipides majoritaires, proportionnellement équivalente. Ceci laisse penser que la biosynthèse des protéines soufrées est directement liée au métabolisme des sulfolipides La biosynthèse des nucléoprotéines, serait, elle, indirectement liée à la biosynthèse des lipides phosphorés et plus directement au métabolisme des phosphates esters des glucides. Cependant cette chaîne métabolique paraît beaucoup plus complexe en réalité. La mise en carence des cultures après marquage met en évidence indirectement le transfert des sulfates marqués glucidiques et lipidiques aux formes sulfydriles protidiques. Ceci implique une réduction du sulfate fourni après marquage préalable des sulfonates glucidiques et lipidiques. Les sulfates incorporés seraient progressivement réduits selon un pro-

cessus précis, avant d'être éliminés sous formes plus ou moins assimilables par les thalles. Ces formes réduites indispensables à l'ajustement des niveaux énergétiques du soufre organique, des protides, lipides et glucides intracellulaires.

Afin de préciser cette voie métabolique, du soufre intracellulaire, nous avons procédé aux expériences suivantes en fournissant du sulfure de sodium aux cultures à la concentration de 0,5 Mole/litre d'eau de mer au lieu des sulfates de la façon suivante:

Après marquage des thalles au radiosulfate durant 8 jours afin de charger au maximum : glucides, protides et lipides intracellulaires, on soumet les cultures à une carence en soufre pendant 10-15 jours. Ainsi les teneurs en radiosulfates incorporés atteignent leur minimum. Les analyses des glucides, lipides protides soufrés accusent alors une diminution sensible. Ainsi les glucides totaux perdent 40%, les lipides polaires soufrés : 6%, et les protéines soufrées 1%.

Si on place les algues ainsi carencées dans un milieu contenant pour seule source du sulfure de sodium, 15 à 20 jours sont nécessaires pour effacer les effets de carence en soufre. Mais, avec des sulfates, la croissance repart rapidement en une semaine ou dix jours tout au plus; les effets de carence sont complètement enrayés. Les analyses des sulfates totaux montrent une augmentation très lente de leur quantité. Les polysaccharides regagnent 2% en 10 jours, 5% après 15 jours d'apport du sulfure de sodium. Les glucides intracellulaires maintiennent leur taux initial. Les lipides soufrés ont regagné 0,5 - 1 % de sulfates, mais les sulfonates sont à l'état de traces. Les protéines soufrées ont retrouvé leur taux normal dès le 5 ème jour. Cependant les activités métaboliques des thalles restent très faibles car l'assimilation photosynthétique est toujours réduite au minimum car les lipides soufrés majoritaires sont encore pauvres.

Avec un apport de sulfate, les teneurs en sulfates polysaccharidiques des parois redeviennent normales en 4-5 heures. Les glucides sulfatés intracellulaires augmentent progressivement et en 8-10 h. tous les glucides intracellulaires sont sulfatés. Les valeurs en lipides sulfatés et sulfonés s'accroissent progressivement en 8-12 h elles deviennent identiques aux valeurs témoins en 3-4 jours. Les protéines soufrées retrouvent très vite leur taux initial et quatre à cinq heures après l'apport de sulfates, les protéines soufrées dépassent de 2% les valeurs témoins, puis elles se normalisent ensuite en 3 ou 4 jours. Le sulfure de sodium peut donc être substitué aux

sulfates mais seulement dans le seul cas de cultures d'algues carencées en soufre. Dans ce cas, on constate que:

a) la teneur en soufre des protéines se normalise rapidement

b) m is que la normalisation des teneurs en sulfates: des glucides, des lipides exige un temps beaucoup plus long. Il est donc vraisemblable que le sulfure de sodium fourni est recyclé au préalable, par oxydation graduelle, en sulfate , avant d'être intégré aux glucides et aux lipides , alors que le niveau énergétique du sulfure est proche de celui des acides aminés sulfydrylés composant les protéines algales. Or les sulfures sont facilement oxydables. Dansun milieu biologique où O^{--} est abondant,,en raison des intenses activités métaboliques des cellules vivantes, les oxydations en sulfates sont alors très favorisées et le processus de recyclage des sulfures est activé, permettant la recharge en sulfates des macromolécules, palliant à la déficience et aux besoins de surv e des thalles.

Si l'apport en sulfures de sodium se fait au niveau des frondes et non plus au niveau des crampons des algues carencées, on constate un rétablissement plus rapide encore:

a) des protéines soufrées

b) des glucides et des lipides sulfatés et sulfonés.

Si dans les mêmes conditions, on fait un apport de sulfates, le retour à la teneur normale en protéines soufrées est plus long; les recharges des glucides et des lipides en sulfates sont au contraire accélérées. La reprise de la culture est nettement plus rapide encore (cf, tableaux XVIII, XIX et courbes 10, 11, 12). On en déduit alors que l'absorption par les frondes est beaucoup plus rapide, c'est le processus normal des algues régulièrement immergées.

Il semble que l'absorption au niveau des crampons soit très active, résultant simplement d'échanges osmotiques tandis que l'absorption par les frondes se ferait par saccades et succion "type pompe" exigeant alors certaines dépenses énergétiques, nécessitant donc une énergie supplémentaire pour l'absorption du sulfure de sodium par les algues en cas de carence. Cet apport en soufre réduit compense le manque de sulfate pour les protéines en cas de nécessité.

La nécessité du soufre et du phosphore dans la nutrition animale et végétale est connue depuis longtemps. L'étude des effets de la carence surla croissance et le développement a été stimulée

en recherche agronomique et pour les végétaux supérieurs afin d'obtenir des rendements supérieurs. Pour de nombreux auteurs, ce seul aspect économique a motivé de très nombreux travaux (111-116); quelques études furent consacrées à l'aspect physiologique des carences en S et en P (117).

Les résultats de notre travail montrent l'importance de ces éléments; nous avons ainsi démontré la filiation de diverses substances au cours de leur biosynthèse. L'importance des lipides phosphorés et soufrés est donc très grande: ce sont les plaques tournantes des métabolismes de toutes les macromolécules phosphorées et soufrées des cellules vivantes.

Grâce à l'emploi des isotopes radioactifs: l'absorption du soufre et du phosphore, leur mode dedistribution dans la plante et dans la cellule sont définis. Certains auteurs ont déjà observé que les lipides permettent la fixation du soufre et du phosphore. D'autres ont signalé leur accumulation dans des substances insolubles du mésophylle des feuilles. Il semble même que les parties aériennes des végétaux sont généralement riches en produits sulfatés, pauvres en produits phosphorés. Dans les racines et autres organes souterrains les substances accumulées sont principalement phosphorées. Mais phosphates et sulfates sont toujours présents en grande quantité dans les méristèmes et les organes jeunes, actifs.

L'absorption des sulfates est sous contrôle enzymatique; notre méthode de marquage laisse suggérer que cette absorption se fait par simple succion osmotique. Mais l'incorporation de S * et P * dans les macromolécules exige un système plus complexe d'enzymes. Celles permettent la formation des S et P oxydés et réduits, exigés pour leur intégration dans les macromolécules.

Pour des algues carencées, l'assimilation des formes réduites des S et P ne peut se faire que si les structures importantes, celles des chloroplastes en particulier, n'ont pas encore été désorganisées. Il existe donc un seuil critique de la carence, au delà duquel la mort intervient quelque soit le remède apporté à l'algue carencée. Toutes les désorganisation structurales atteignant les chloroplastes et autres organites intracytoplasmiques, entraînent inévitablement, des chaînes de variations dans les teneur et composition des équipements lipidiques de la plante. Tout le métabolisme de l'organisme

TABLEAU XVIII

Incorporations des radiosulfates dans les diverses substances algales des thalles carencés et non carencés en fonction du temps

cpm au départ=$4,5.10^4$

Espèces / Lipides		Pelvetia canaliculata				Fucus vesiculosus				Fucus serratus			
		30"-1'	5-25'	1-15h	20-96h	30"-1'	5-25'	1-15h	20-96h	30"-1'	5-25'	1-15h	20-9
		cpm											
Polysaccharides sulfatés.	T_{NC}	0	900	1200	28000	0	600	800	15000	0	500	650	1200
	T_C	0	1200	2500	30000	0	900	960	16000	0	680	1000	1350
Sucres sulfatés intracellulaires	T_{NC}	0	0	300	4000	0	0	100	4500	0	0	200	300
	T_C	0	200	500	5500	0	50	200	4600	0	0	400	380
SL_T	T_{NC}	0	0	100	2800	0	0	100	2900	0	0	180	220
	T_C	0	0	200	3200	0	0	180	3100	0	0	160	300
X_{11}	T_{NC}	0	0	100	240	0	0	100	200	0	0	100	200
	T_C	0	0	180	270	0	0	150	280	0	0	180	220
$X_{11'}$	T_{NC}	0	0	90	230	0	0	100	300	0	0	120	200
	T_C	0	0	140	250	0	0	160	280	0	0	180	300
X_{12}	T_{NC}	0	0	150	500	0	0	250	600	0	0	200	380
	T_C	0	0	150	800	0	0	200	620	0	0	220	400
X_{13}	T_{NC}	0	0	405	1230	0	0	130	1310	0	0	100	400
	T_C	0	90	490	1248	0	30	180	1400	0	80	120	420
X_{14}	T_{NC}	0	10	250	1250	0	10	100	700	0	50	150	300
	T_C	0	30	210	1270	0	20	100	760	0	100	180	340
X_{15}	T_{NC}	0	20	120	750	0	10	0	400	0	30	200	380
	T_C	0	40	180	780	0	30	80	480	0	40	240	380
Protéines soufrées.	T_{NC}	0	0	0	60	0	0	0	68	0	0	0	70
	T_C	0	0	0	60	0	0	0	67	0	0	0	70

Nota. T_{NC} = Thalles non carencés

T_C = Thalles carencés

cpm = coup par minute

(Toutes les valeurs données dans ce tableau ne comprennent pas les bruits de fond qui sont de l'ordre de 10% en sus)

TABLEAU XIX

Incorporation des radiophosphates dans les diverses substances algales des thalles carencés et non carencés en fonction du temps.

Espèces / Lipides		Nombre de coups par minutes (cpm) Pelvetia canaliculata — Nombre de coups par minute au départ = I,5.I0^4				Fucus vesiculosus				Fucus serratus			
		30"-I'	5-25'	I-I8h	20-96h	30"-I'	5-25'	I-I8h	20-96h	30"-I'	5-25	I-I8h	20-96h
...saccha... ...phos... ...tes.	T_{NC}	0	0	500	6200	0	20	550	7000	0	I0	450	8200
	T_C	0	50	480	7000	0	80	400	7200	0	30	5I0	8400
...re phos... ...te intra ...laires	T_{NC}	0	0	I80	2950	0	0	550	2400	0	0	260	3I00
	T_C	0	0	280	3200	0	0	500	2450	0	0	300	3800
PL_T	T_{NC}	0	0	60	2800	0	0	200	3200	0	I00	400	6200
	T_C	0	0	I80	2850	0	0	300	3I00	0	200	400	6300
X_1	T_{NC}	0	0	00	250	0	0	0	280	0	0	50	300
	T_C	0	0	52	250	0	0	80	290	0	0	40	350
X_2	T_{NC}	0	0	30	300	0	0	25	280	0	0	20	250
	T_C	0	0	45	3I0	0	0	30	300	0	0	25	300
X_3	T_{NC}	0	0	49	350	0	0	40	320	0	0	30	3I0
	T_C	0	0	52	340	0	0	50	320	0	0	25	330
X_4	T_{NC}	0	0	30	300	0	0	40	300	0	0	40	280
	T_C	0	0	50	3I0	0	0	50	280	0	0	30	3I0
X_5	T_{NC}	0	0	80	400	0	0	I00	500	0	0	40	400
	T_C	0	0	85	380	0	0	I00	450	0	0	50	450
X_6	T_{NC}	0	0	70	350	0	0	60	500	0	0	20	280
	T_C	0	50	I50	4I0	0	20	I20	480	0	I0	90	385
X_7	T_{NC}	0	0	30	5I0	0	0	200	540	0	0	I0	I50
	T_C	0	I0	50	560	0	90	2I0	500	0	I0	30	I80
X_8	T_{NC}	0	I0	49	600	0	I0	220	560	0	I0	20	I50
	T_C	0	30	60	780	0	20	200	570	0	30	50	200
X_9	T_{NC}	0	20	40	I80	0	20	0	I0	0	30	200	2400
	T_C	0	40	60	I95	0	30	0	30	0	60	220	2300
X_{10}	T_{NC}	0	I0	I5	I80	0	I0	I0	I50	0	0	I0	I50
	T_C	0	20	20	I60	0	20	I0	I60	0	40	I0	I80
...sphores ...lipidi ...s.	T_{NC}	0	0	0	80	0	0	0	82	0	0	0	84
	T_C	0	0	0	83	0	0	0	86	0	0	0	80

Nota. T_{NC}, T_C = Thalles carencés et non carencés.
(Ces valeurs sont des valeurs spécifiques, bruits de fond déduits.)

est de ce fait directement ou indirectement touché progressivement, mais infailliblement et les algues deviennent inaptes à vivre même dans leur milieu écologique normal.

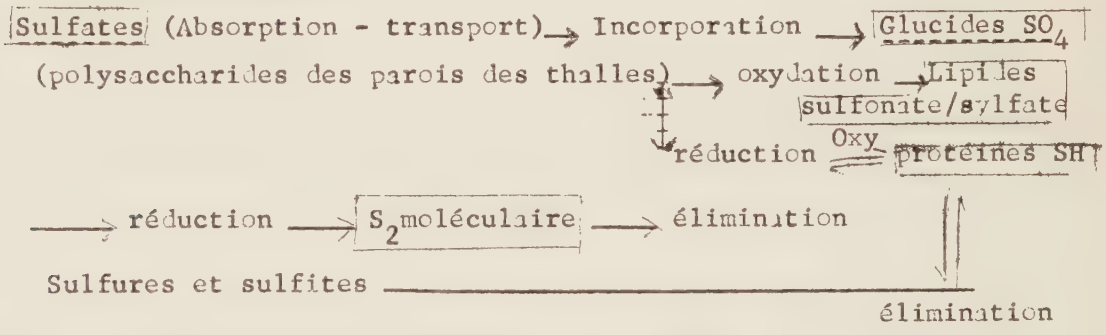
EAGLE et EATON ont déjà constaté que des variations brutales de l'alimentation en soufre et en phosphore provoquent, chez les végétaux, une variation incontrôlée des protéines soufrées dans les feuilles modifiant ainsi la capacité photosynthétique de la plante. Ils ont aussi mentionné, faisant suite aux carences, les variations consécutives du soufre et du phosphore des molécules hydrophobes parmi lesquelles sulfo et phospholipides. YOSHIRO et Mc CALLA pensent plutôt à une glucoliprotéine inconnue pourvue d'un groupe sulfonate et présente principalement dans les tissus chlorophylliens.

WILLENBRUCK rapporte à son tour que les carences en soufre et en phosphore modifient largement les proportions soufre/azote. Cependant il ne précise pas s'il s'agit de lipoprotéines ou de lipides soufrés ou phosphorés extraits au cours de ses travaux.

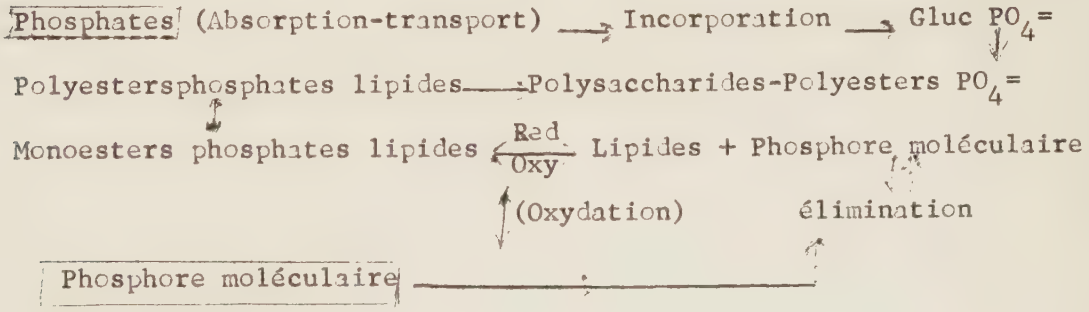
Ces résultats confirment donc l'importance du S et du P engagés dans les sulfo et phospholipides, donnant à ceux-ci un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire et la physiologie de tout l'organisme

Ci-dessous sont résumées les voies possibles de transfert du soufre et du phosphore chez les Algues:

1 - Cas du soufre


Sulfates (Absorption - transport) Incorporation Glucides SO_4
(polysaccharides des parois des thalles) oxydation Lipides sulfonate/sylfate
réduction Oxy protéines SH
réduction S_2 moléculaire élimination
Sulfures et sulfites
élimination

2 - Cas du phosphore


Phosphates (Absorption-transport) Incorporation Gluc PO_4=
Polyestersphosphates lipides Polysaccharides-Polyesters PO_4=
Monoesters phosphates lipides Red Oxy Lipides + Phosphore moléculaire
(Oxydation) élimination
Phosphore moléculaire

Nous proposons enfin le schéma suivant résumant les différentes étapes physiologiques des lipides polaires à l'intérieur des cellules chez les trois algues.

Lumières

↓

pigments photosynthétiques

(première phase de la réaction 1 aire de la cinétique photosynthétique

↓

Lipides polaires majoritaires fonctionnels des chloroplastes (monoesters sulfates et phosphates pour les P.canaliculata et Fucus vesiculosus), polyesters sulfates et phosphates pour les Fucus serratus

I.Périodes éclairées (deuxième phase de la réaction laire de la cinétique photosynthétique)

↓

Lipides polaires minoritaires fonctionnels des chloroplastes (polyesters sulfates et phosphates des P. canaliculata et Fucus vesiculosus et monoesters sulfates et phosphates des Fucus serratus)

(troisième phase de la réaction 1 aire de la cinétique photosynthétique = transfert d'énergie captée pendant la phase laire de la photosynthèse)

↓

Lipides majoritaires des mitochondries ⟷ Lipides minoritaires

↓

II.Péride obscure — Lipides constituttifs des formations cytoplasmiques non chloroplastiques ni mitochondriales ⟶ métabolisme d'autres substances phosphorées et soufrées non lipidiques ou lipidiques

CONCLUSIONS GENERALES

Chez trois Fucacées : Pelvetia canaliculata, Fucus vesiculosus et Fucus serratus ,nous avons donc mis en évidence de nombreux lipides polaires, dont certains ne figurent pas encore dans la nomenclature actuelle.

Nous avons ensuite étudié les variations qualitatives et quantitatives des lipides polaires des trois algues dont les habitats sont naturellement tres différents.

Ainsi les Pelvetia canaliculata sont riches en lipides soufrés totaux et relativement pauvres en lipides phosphorés totaux. Les Fucus serratus par contre sont plus riches en phospholipides totaux qu'en sulfolipides totaux. Pour les Fucus vesiculosus leurs teneur et composition en lipides polaires sont plus proches de celles des Pelvetia canaliculata que de celles des Fucus serratus. Au niveau des espèces: les Fucus serratus sont plus riches en phospholipides totaux et plus pauvres en sulfolipides totaux que les Pelvetia canaliculata et Fucus vesiculosus.

Parmi les lipides polaires individuels nous avons montré que les lipides soufrés des Fucus serratus sont riches en soufre: les di ,tri et même tétra esters sulfates lipides sont très abondants dans cette espèce. De plus les di et triesters phosphates lipidiques sont aussi les constituants majeurs des équipements lipidiques de ces algues. Dans Fucus vesiculosus et dans Pelvetia canaliculata les mono ou diesters sulfates et phosphates sont au contraire plus abondants. Par ailleurs la répartition des différents lipides polaires dans les divers organites cellulaires est la suivante: les sulfolipides sont en general les constituants des chloroplastes, à l'exception des dialcols sulfates à longue chaîne aliphatique identifies au cours de ce travail. Ces dialcools sont présents dans les formations cytoplasmiques non chloroplastiques. Les glycolipides phosphorés font aussi partie des chloroplastes généralement, mais certains d'entre eux sont aussi des constituants mitochondriaux. Vraisemblablement les glycolipides transitent entre ces deux principaux organites cellulaires. Les phosphatides sont des constituants cytoplasmiques nonchloroplastiques, et ils sont absents des appareils photosynthétiques.

Compte tenu de ces résultats nous avons conclu chez les trois espèces étudiées à l'existence de deux types polaires dépendant: des conditions d'éclairage, de l'habitat. Le premier désigné par "type FS" est à dominance de di et triesters sulfates et phosphates lipides. Ces lipides sont dynamiquement actifs dans l'assimilation photosynthétique de l'énergie captée. Les monoesters sulfates et phosphates font aussi partie de ce "type FS" mais leur activité dans l'assimilation photosynthétique n'est que potentielle. Le deuxième type dit "type PC" est calqué sur le modèle de l'équipement lipique des Pelvetia canaliculata où les monoesters sulfates et phosphates lipides sont majoritaires. Les di, tri et tetraesters sulfates et phosphates lipides sont présents mais en faibles quantités. Leur activité dans l'assimilation photosynthétique est surtout potentielle. Les monoesters lipides sont plus fonctionnels dans le type PC, et leur activité est dynamique.

Les variations des teneur et composition en fonction de divers facteurs, dont la lumière et les rythmes des marées, montrent en outre que les modifications qualitatives et quantitatives de ces facteurs induisent les remaniements plus ou moins profonds de l'équipement en lipides polaires des algues.

Dans le cas de la lumière la variation qualitative fait: diminuer les teneurs en di, tri et tetraesters sulfates et phosphates si l'éclairage est riche en lumières de grandes longueurs d'onde. Si les lumières de courtes longueurs d'ondes sont prépondérantes: les monoesters sulfates et phosphates diminuent proportionnellement. Il est donc évident que les polyesters sulfates et phosphates sont des lipides fonctionnels pour les lumières de courtes longueurs d'ondes tandis que les monoesters sulfates et phosphates sont actifs vis à vis des lumières de grandes longueurs d'onde. L'alternance obscurité/lumière expérimentée montre en outre que les variations quantitatives des lumières interviennent de deux façons différentes sur les variations de la teneur et de la compositionen lipides polaires. Dans le cas d'une variation faible et transitoire de l'intensite lumineuse les remaniements des lipides polaires sont superficiels, les lipides polaires majoritaires des chloroplastes sont les premiers atteints et affecte seulement le degré de saturation potentielle des acides gras

constitutifs . En cas d'augmentation de l'intensité lumineuse une tendance très nette à la saturation potentielle est enregistrée, mais par contre si l'intensité diminue transitoirement l'insaturation potentielle des acides gras des lipides polaires est manifeste. La quantité totale en lipides polaires ne varie pas dans le cas de variation quantitative de la lumière, de faible amplitude et de courte durée. Si la variation quantitaive de lumière est importante et de longue durée, les remaniements sont beaucoup plus profonds et atteignant dans ce cas a la fois les teneurs et les compositions de tous les lipides polaires. Les lipides phosphorés totaux sont plus abondants que les lipides soufrés totaux sous des éclairages de très faible intensité et si ces périodes non éclairées sont de plus longue durée que les périodes d'eclairement intense. Inversement si les intensités lumineuses sont fortes et les periodes d'obscurité courtes , les sulfolipides totaux s'enrichissent et surpassent les quantités de phospholipides totaux.

Ces observations/ montrent que les phospholipides en général, et en particulier ceux des chloroplastes sont les lipides/ fonctionnels de plantes "d'ombre" pour lesquelles les lumières dispensees sont quantitativement peu intenses et la semi-obscurité est de plus longue durée que la période d'éclairement. Les sulfolipides constitutifs des chloroplastes en particulier, sont sont des lipides fonctionnels des plantes "de lumière" chez lesquelles les eclairages sont intenses et les périodes d'éclairement plus longues que les périodes obscures. Les diverses expériences demontrent explicitement que quelle que soit l'espèce les effets de la lumière sur les variations des teneur et composition en lipides polaires sont tout à fait identiques. Elles portent en premier et plus ou moins profondément sur les lipides polaires des chloroplastes. Les teneur et composition en lipides polaires des autres formations cytoplasmiques,non chloroplastiques,varient aussi mais en second lieu et en corrélation étroite avec les constituants lipidiques des chloroplastes.

Ceci explique en outre une certaine filiation métabolique de l'ensemble des lipides polaires des algues en particulier et de tous les végétaux vraisemblablement. Il est donc important de signaler que des variations de lumière, qualitatives et quantitatives, provoquent des remaniements qualitatifs et quantitatifs

des lipides polaires des chloroplastes, rapprochant ou écartant les taux de ces lipides polaires soit vers le "type FS" soit vers le "type PC". Se référant à l'écologie de l'espèce nous pouvons établir un parallèle entre les conditions écologiques et l'équipement en lipides polaires des chloroplastes de chacune des trois espèces choisies. En ce qui concerne les lipides polaires des mitochondries et d'autres formations cytoplasmiques non chloroplastiques, les variations de lumiere ne semblent avoir aucun effet direct sur leurs lipides polaires. Par contre des modifications en "ricochet" existent, permettant vraisemblablement un réajustement au niveau énergétique de leurs lipides à activites métaboliques dynamique et potentielle avec celui des lipides polaires modifies des chloroplastes. Dans le cas de carences en soufre ou en phosphore dont les effets à courte et longue échéance, portent d'abord sur les lipides polaires non chloroplastiques en affectant directement l'ensemble de ces lipides.

Les lipides polaires chloroplastiques sont encore remaniés secondairement et par voie de conséquence. Il semble que ces remaniements se déroulent selon le processus suivant :

a) - Quel que soit le type d'activité, métabolique ou photosynthétique, si les activité sont fortes, les lipides polaires à activités dynamiques sont toujours remaniés en premier et plus ou moins profondement selon l'importance de la variation du facteur en cause.

b) - Puis les lipides polaires à activité potentielle sont ensuite qualitativement et quantitativement modifiés en conséquence mais toujours d'une valeur définie, suffisante, pour ajuster leurs niveaux énergétiques à ceux des lipides à activité dynamique.

Dans les cas d'immersion continue et d'émersion permanente l'interprétation est beaucoup plus complexe. Les variations des teneur et composition en lipides polaires, dans ces conditions, sont déterminées à la fois par les variations anormales de la lumière, qualitatives et quantitatives, mais aussi par des modifications profondes des activites métaboliques. En effet, en immersion continue, les lumières sont déficientes, en permanence. Les effets secondaires s'additionnent, en plus l'activité métabolique qui est de plus en plus réduite: il y a alors doubles répercussions simultanees sur les variations des teneur et composition

en lipides-lipides polaires des chloroplastes et d'autres formations cytoplasmiques. Si bien qu'il est quasiment impossible de faire la part des effets individuels de chacun de ces facteurs. Il en est de même pour le cas d'émersion permanente. Ici lumière et obscurité sont alternées par successions du jour et de la nuit, mais les rythmes circadiens des marées auxquels les algues sont habituées sont profondément perturbés. De plus des activités métaboliques très intenses sont installées en permanence, la somme des effets accumulés de ces modifications d'activités tant photosynthètiques que métaboliques rendent le problème complexe, son interprétation difficile.

Enfin les marquages isotopiques nous ont permis d'établir les filiations biosynthetiques de diverses substances biochimiques soufrées et phosphorées, dont les glucides, lipides et protides, identifiées ici.

Les sulfo- et phospholipides placés, au centre des voies de biosynthèse de tous les métabolites soufrés et phosphorés constitutent ainsi une sorte de plaque tournante. Ils sont donc des intermédiaires biochimiques tres importants dans la biologie de nos trois Fucacées.

Les dispositions enthalpiques des sulfo et phospholipides permettent en outre les variations des potentiels/oxydo-réduction dans de larges limites, ce qui, entre autres leurs confèrent un rôle prépondérant dans le transfert de l'énergie dont ils sont alors dépositaires.

Enfin, signalons que sulfates et sulfonates lipidiques étant doués d'une grande réactivité chimique, de très vastes champs d'investigation peuvent ainsi s'ouvrir vers la connaissance de ces métabolites soufrés constituants, plastiques ou catalytiques des cellules

BIBLIOGRAPHIE

(I) FELDMANN (J) 1957 : Colloques internationaux du CNRS N° 81 ,37

(2) PHAM-QUANG-LIEM, M.H. LAUR & C. PAQUOT, 1970 ; Oléagineux 25, 223-225

(3) FOLCH (J), LEES (M.), SLOANE-STANLEY (G.H.), 1957: J. Biol. Chem.,226,197.

(4) BLIGH (E.), DYER (W.), 1959 : CANAD.J.Biochem. Physiol. 37,911

(5) KAHANE (E), 1963 : C.R.Acad. Sc. Paris, 257,1996-1998

(6) PHAM-QUANG-LIEM.(M.H.) LAUR, 1974 : Biochimie 56, 6/7,925-935

(7) WELLS (M.A.),DITTMER (J.C), 1963 : Biochimie 2;1259 .263

(8) PAQUOT (C.),PHAM QUANG Liem ,, MH.LAUR, 1970 : Rev.Franc. Corps gras.17,547-550

(9) LAUR (M-H),PHAM-QUANG Liem , 1970 : C.R.Acad.Sc.Paris, 271,D,1752-1755

(10)PHAM-QUANG-LIEM,M.H.LAUR, 1970 : Bul.Soc.Phyc.Fr, 16,111-115

M.H. LAUR, 1965 : Rev.Gen.Bot,72,57.156

(11)PHAM-QUANG-LIEM,M.H.LAUR, , , 7 ;

1974:Botanica marina sous presse

(12)STOFFYN(P.),KEANE (W), 1964:Anal. Chem. 36,397-399

(13)BERTOLANICI R.J.,BARNEY J.E., 1957:Anal.Chem.29,281

(14)LONG C. et STAPPLES,D.A.

1959:Biochem.J.73,7p

1959: " " ",385

1960: " " 75,16p

1961: " " 78,179

(15)LONG C.,SHAPIRO B.,& STAPPLES D.A, 1960 : Biochem. J. 75,17p

(16)LONG C. & PENNY I.F., 1957:Biochem J. 65,382

(17)JONES A.S. & LETHAM D.S., 1956:Analyst,81,15

(18)DOGSON K.S. & SPENCER B, 1957:Methods of biochemical analysis,4,211

BERGLUND F. & SORBO B., 1960:Scand.J.Chim.Lab.Invest 12,147

(19)ARTOM C., 1945:J.Biol.Chem,I57,585
(20)KAR K.P.,NATH N.J., 1957:Ind.Res.India,16b, 563
(2I)FISKE.C. & SUBBAROW.Y., 1926:J.Biol.Chem.66,375
(22)KJELDAHL (méthodes classiques)
LANG C.A., 1958:Anal.Chem.30,I692
(23)HANAHAN D.J.,NOLLEY J.,I958:J.Biol.Chem.23I,8I3
PHAM-QUANG-LIEM,M.H. LAUR, 197I:Soc.Phycol.de France, 16,III-II5
YAGI & A.A BENSON, 1962:Biochem.Biophys. Acta,57, 6
PRIVETT O.S & M.L BLANK., 1963:J.Am.Oil Chemists' Soc.40,70
HANAHAN D.J., 1960:Lipid chemistry p7I
(24)DESNUELLE M,NAUDET M.,ROUZIER J., I948: Biochem.Biophys. Acta,2,56I
(25)PHAM-QUANG-LIEM, C.PAQUOT & M.H. LAUR, 1970:Rev. Franc. des Corps gras, 8-9,547-550.
E.MARTENSSON, 1966:Biochem.Biophys Acta,II6,296
(26)DENIGES G.Précis de Chimie analytique
(27)B AILLY M.C, 1958:C.R.Acad.Sc,206,I902
(28)FAURE.M. Thèse Sciences I940 PARIS
(29)FLEURY P. & FATOME M., 1955:J.Pharm.Chim,2I,247
(30)RAMSAY W. & STEWART C., 194I:Biochem.J,35,39
(3I)BURMASTER C., 1946 :J.Biol.Chem.I64,233
WELLS M.A.,DITTMER J.C (1965),Biochem,4,2459
(32)HANDLER P., 1947:Biol.Symposia,I2,36I
(33)THANNAUSER S.,BENOTTI J.,REINSTEIN H., 1939:J.Biol. Chem.,129,709
(34)APPLETON H.,LA DU B.,LEVY B,STEELE J. & BRODIE B. 1953:J.Biol.Chem.,205,803
HACK M., 1947.J.Biol.Chem.,169,137
(35)ARTOM C.J., 1965:J.Biol.Chem.,I57,585
AXELROD J.,REICHENTHAL & BRODIE B., 1953:J.Biol. Chem.,804.902
LEVINE C.& CHARGAFF E., 195I:J.Biol.Chem.,I92,465
HANAHAN D.J.,DITTMER J.C.,FEMELLA J.L., 1958:J. Biol.Chem.233,862
(36)Mc KIBBIN J.M. & TAYLOR W.E., 1949:J.Biol.Chem.,178, 199

H.E CARTER,DIMITRIS S.,GALANOS R.,GIGG R.H.,JOHN H. LAW,TEISHI NAKAYAMA,SMITH D.B. & WEBER E.J,
1957 :Fed.Proc.16,817-824

THUDICHUM J.L.W.
1901:J.Prakt.Chem 25,19

CARTER H.E.,NORRIS W.P.,GLICK F.J.,PHILIPPS G.E.,HARRIS R.,
1947:J.Biol.Chem.170,269

CARTER H.E.,GALANOS D.S. & FUJINO Y
1956:Can.J.Biochem.Physiol,34,320

DISCHE Z.
1957:J.Biol.Chem,167,189

YAMKAWA T. & SUZUKI S.
1953:J.Biochem (Japon) 40,7

YAMAKAWA T. MATSUMOTO M.,SUSUKI S.,IIDA T.,
1956:J.Biochem (Japon) 43,41

KLENK E.
1939-40:Z.Physiol.Chem. 262,128
1942: " " " 273,76,253

SVENNERHOLM L.
1956:NAT 177,524

FOLCH J.,MEATH J.A.,BOGOCH S.
1956:Fed.Proc.15,254

(37)SIAKOTOS A.N. & ROUSER G.
1965:J.Amer.Oil Chem. Soc. 42,913-919

WELLS M.A. & DITTMER J.C.
1963:Biochem. 2,1259-1263

ROUSER G.,KRITCHEVSKY G.,GALLI C. & HELLER D.
1965:J.Amer.Oil Chem. Soc. 42,2175-227

(38)RAPPORT & ALLONZO N.
1955:J.Biol.Chem.178,199

(39)SWEELY W. & WELLS W, BENTLEY R.
1971 :Methods in enzymology Vol 8 et 28

BROOKS C.J.W. & McLEAN
1971: J.Chrom.Sc. 9,18

EISENBERG F.J.
1971:J.Carb.Res.19,135

(40)FLEURY P. & RECOULES A.
1948:C.R.Acad Sc,227,691.

WOOLEY D.J.
1941:J.Biol.Chem.140,453

MORELEC-COULON M.J. & FAURE M.
1958:Bull.Soc.Chim.Biol. 40,1307
AGRANOFF B.W. BRADLEY R.M,BRADY R.O.
1968:J.Biol. Chem. 233,1077
(41)KENNEDY G.Y,COLLIER R.
1962:Comp.Biochem.Physiol.7,179-197
1963:J.mar.biol.Ass.U.K. 43,613
BØAS N.F., 1953:J.Biol.Chem. 205,553
FISCHER F.G. & NEBEL H.J., 1955:Z.Physiol.Chem. 302;
10
STOFFYN P.J. & JEAN LOZ R.W., 1954:Arch.Biochem.
Biophys. 52,373
SPIRO R.G., 1959:J.Biol.Chem. 234,742
(42)REISSIG J.L. & STROMINGER J.L & LELOIR L.F.
1955:BBA 217,959
(43)REISSIG J.L Complex Carbohydrate Vol 3,23
(44)STROMINGER J.L.,PARK J.T.,THOMPSON R.E
1959:J.Biol.Chem. 234,3263
G.ASHWELL,BROWN N.C,VOLK W.A
1965:Arch.Biochem.Biophys. 112,648
(45)GURIN S. & HOOD D.B
1941:J.Biol.Chem. 139,775
(46)HOLZMAN G.,Mc ALLISTER R.V. & NIEMAN C.
1947:J.Biol. Chem. 171,27
(47)MOKRASCH L.C., 1954:J.Biol.Chem. 208,55
(48)SOERENSEN M. & HAUGAARD G.
1933:Biocher Zeit, 260,247
(49)MARKOWITZ A.S,ARMSTRONG S.H.,KUSHNER D.S.
1960:Nat. 187,1095
(50)DISCHE Z., 1949:J.Biol.Chem. 181,379
(51)DISCHE Z. & SHETTLES L.B.
1948:J.Biol.Chem. 175,595
DISCHE Z.
1955:Methods of biochemical analysis 2,313
1953:J.Biol.Chem. 204,983
(52)OFNER R., 1929:Chem.Zeit.53,683
(53)ROE J.H., 1934:J.Biol.Chem. 107,15
(54)ASPINALL G.O,JAMIESON R.S.P.,WILKINSON J.F.
1956:J.Chem.Soc. 34,83

(55)DEISCHMANN W., I943:J.Lab.Clin.Med. 28,770
(56)F.SMITH & UNRAU A.M., I959:Chem.Ind.,p.88I
SPIRO R.G., I964:J.Biol.Chem. 239,567
ANDERSON B. & SENO N.,SAMPSON P.,RILEY J.G,HOFFMANN P.,MEYER K. & J.
I964:J.B iol.Chem. 239,PC 27I6.
(57)GOTTSCHALD W.H.,MURPHEY E.,GRAHAM R.B.
I962:Nat. I05I I94
SPIRO M.J. & SPIRO R.G., I962 J.Biol.Chem.237,I507
(58)REES D.A., I963:Biochem.J. 88,343
SPIRO R.G., I967:J.Biol.Chem. 242,48I3
ARIMA T. & SPIRO R.G., I972:J.Biol.Chem. 247,I836
WEBER P.,WINZLER R.J.
I970:Arch.Bioch.Biophys.,I37,42I
SATTO H.,YAMAGATA T.,SUZUKI S.
I968:J Biol.Chem.243,1546
I968:J.Biol.Chem 243,I536
I968: " " 243,I523
(59)BENSON A.A.,PAOLETTI R.,KRITCHEVSKY D.
I963:Adv.in Lip.Res.Vol.I P.387
(59)BENSON A.A.,DANIEL H.,& WIESER R.
I959:Pric.Nat.Acad.Sc.U.S,45,I582
(60)BENSON A.A. & SHIBUYA I.,LEWIN R.A.
I962:Physiol.Biochem. of Algae p.37I
BEN SON A.A.,WISER R.,MARUO B.
I960:Proc.IV Intern.Cong.Biochem.Vol.I5 p.205
(6I)ORR T.E., I968:J.Biol.Chem. 243,2077
(62)LLOYD A.G.,DOGSON K.S.,PRICE K.S,ROSE F.A.
I96I:BBA,46,I08
(63)LLOYD A.G.,TUDBALL N., & DODGSON K.S.
I96I:BBA 46,I08
LLOYD A.G.
I960:Biochem J.75,478
I962: " " 83,455
LLOYD A.G. & DODGSON K.S.
I959:Nat. I84,548
I96I:BBA 46,II6

(64)Mc KENNA J. & NORYMBERSKY J.K.
I957:J.Chem.Soc. 38,89
(65)ASPINALL G.O.,Mc KENNA J.P.
I968:Carbohyd.Res,7,244

(66)BARRY V.C., Mc CORMICK J.E.
I957:J.Chem.Soc. 2777
Mc CORMICK D.M.,CHASSY B.M.,TSIBRIS J.C.M.
I964:BBA,89,447
(67)PERCIVAL E.G.V., I945:J.Chem.Soc.II9
(68)PERCIVAL E.G.V., I949:Quart.Rev. 3,369
(69)PERCIVAL E.G.V. & SOUTAR T.H.
I940:J.Chem.Soc. I475
(70)FEHER O. & VARGHA L.A.
I966:Acta Chem.Acad ScHung.50,37I
I967: " " " " 55,270
(7I)REIST E.J.,GUEFFROY D.E. & GOODMANN L.
I964:J.Amer.Chem.Soc.86,5658
I963: " " " 85,37I5
(72)KANTOR T.G. & SCHUBERT M.
I957:J.Amer Chem.Soc. 79,I53
(73)SCHUBERT M.
I965:Methods in Carbohydrate Chemistry Vol 5
page I06-I09
(74)TIPSON R.S, I945:Adv.Carbohyd.Chem.I,I93
ISBELL H.S., & TIPSON R.S.
Unpublished results
TIPSON R.S, I953:Adv.Carbohyd.Chem. 8,I07
COHEN A. & TIPSON R.S, RICHARDSON A.C
I963:J.Med.Chem.,6,822
I964:J.Chem.Soc.5364
TIPSON R.S. & COHEN A., I968:Carbohyd.Res. 7,232
LEVENE P.A. & TIPSON RS, I935:J.Biol.Chem. I09,632
LEVENE P.A. & TIPSON R.S, I935:J.Biol.Chem.III,3I3
TIPSON R.S. & COHEN A., I965:CarbohydRes.I,338
(75)ONODERA K.,HIRANO S.,MASUDA F., & YAMAMA T.
I968:Chem.Commun.I538
(76)HIRANO. S.,MANABE M.,MIYAZAKI N., & K. ONODERA
I968:BBA I5C,2I3
(77)KARRER P., & JUCKER E., I952:Helv. Chim.Acta 35,I586
(78)H.SCHMIDT & P.KARRER, I949:Helv.Chim.Acta,32,I37I
SCHMIDT H.
I963:Monastsh 94,I206
I964: " 95,I009,454

SCHMIDT H. & BAUER G.
I964:Ibid,95,I78I
I966: " 97,866
(79)KEAN E.L., I968:J.Lipid Res. 9,3I9
(80)Mc CANDLESS E.L., I964:Analyst Biochem. 7,357
(8I)WINTERMANS J.F.G.M., I960:BBA,4,502
YAMAKAWA T.,KISO N.,HANDA S.,MAKITA A.,& YOKOYAMA S.
I962:J.Biochem(Tokyo)52,226
YAGI T. & BENSON AA.
I962:BBA,57-60I
(82)WEENINCK R.O., I963:Nat,I97,62
ZILL L.P. & HARMON E.A., I96I:BBA 53,578
TULLOCH A.P. SPENCER J.F.T & DEINEMA M.H
I968:Can. J.Chem. 46,345
TURVEY J.R., I965:Adv.Carbohyd.Chem. 20,I63
TURVEY J.R. & VILLIAMS T.P.
I962:J.Chem.Soc. 2II9
I963:" " " 2242
SUZUKI S. & STRONINGER J.L.
I960:J.Biol.Chem. 234,2768
STOFFYN A & STOFFYN P.J.,MARTENSON, I968:BBA,I53,353
STOFFYN P.J., I966:J.Amer.Oil.Chem.Soc.,43,69
STOFFYN P.J. & KEANE W., I964:Anal.Chem. 36,397
STOFFYN P.J. & STOFFYN A.
I963:BBA,70,I07
I963: " " 2I8
STOFFYN P.J. & STOFFYN A. & MALONE M.
I964:Fed.Proc. 23,229
SVENNERHOLM E. & SVENNERHOLM L.
I963:BBA,70,432
SVENNERHOLM L., I957:BBA,24,604
SVENNERHOLM L. & THORIN H.J., I962:J.Lip.Res.3,483
(83) cf(8)
(84) cf(6)
(85) cf(11)
(86)MIYACHI,S. & MIYACHI,S.,
I966:Plant physiol,4I,479
(87)BURVELL R.L., I945:J.Amer.Chem.Soc 67,220
BENSON A.A., DANIEL H. & WISER,R.
I959:Pric.Acad.Sci.U.S 45,I582

(88)O'BRIEN J.S.,FILLERUP P.L. & MEAD J.F
I964:J.Lipid.Res. 5,I09
DAVIES WW.H, MERCER E.I & GOODWIN T.W
I965:Phyto.Chem. 4,74I
MIYACHI S.,MIYACHI S. & BENSON AA
I966:Protozool.I3,76
COLLIER R. & KENNEDY C.Y
I963:J.Mar.Biol.Assoc.U.K. 43,605
KENNEDY C.Y & COLLIER R.
I963:J.Mar.Biol.Soc.U.K. 43,6I3
HAINES T. & BLOCK R.J., I962:J.Protozool.9,33
KATES M., I960:Biochem.Biophys.Acta 4I,3I5
HAINES T.,PAOLETTI R. & KRITCHEVSKY D.
Advanced in lipid research . Acad.Press N.Y
in preparation.
JACK R.C.M; I964:Contrib. Boyce-Thompson.Inst.22,33I
ROBERTS R.B., ABELSON P.H.,COWIE D.B.,BOLTON K.T.
& BRITTEN R.J.
I957:Carnégie Ins. of Washington Pub.607 p.327
KATES M. & TORANBENE T., Personnal communication.
MIDDLEBROOK G.,COLLEMAN C.M & SCHAEFFER W.B.
I959:Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 45,I80I
KATES M. PALAMETA B. & PERRY M.B. & ADAMS J.A
I967:BBA,I37,2I3
POUSADA M.,DAS B.C., & HAINES T.H., In preparation
(89)THUDICHUM J.L.W
I87? : Researches on the Chemical Constitution of the brain. Report of the medical Officer of the Privy Council, London,N.S N°3 append 5 ppII3-247
THIERFELDER H. & KLENK E.
I930:Chemie der Cerebroside und Phosphatide, Springer Berlin p.63
THUDICHUM J.L.W.
I884:A treatise, on the Chemical Constitution of the Brain,Based through out Upon Original Researches. Baillière,Tindall & Cox London I884
I9I2:LEVENE P.A. J.Biol.Chem. I3,463

THUDICHUM J.L.W
I98I:Die chemische Konstitution Gehrins des Menschen und der Tiere, Pretzcher,Tübingen
(90)HAINES T.H., I96 5:J.Protozool,I2,655
(9I)HAINES T.H.& ZAJIC J.E.
I970:Properties and products of Algae Plenum Press N.Y p. I29
(92)HAINES T.H., I970:Lipids,5,I49
HAINES T.H. & HENRY S.M. & BLOCK, Unpublished observations
HELFERICH B. & HIRMEN E., I928:Ber. 6I,I825
HELFERICH B. & OST O., Z.Physiol.Chem. 33I,II4,I963
HIGASHI S. & HORI T., I968:BBA,I52,568
HOIBERG C.P & MUMMA R.O
I969:J.Amer.Chem.Soc. 9I,4273
HOLMGARD A., I955:Acta Chem.Scand. 9,I038

(93)GOLDBERG I.H., I96I:J.Lipi.Res.,2,I03
(94)GOREN M.B., I970:BBA,2I0,II6,I27
GOREN M.B. & BROKL O.,DAS.B.C. & LEDERER E.
Biochemitry in Press.
GOREN M.B., I969:Bacterid.Proc,2
(95)BENSON AA. & SHIBUYA I.
In Physiology and Biochestry of Algae
I962:Academic Press N.Y.
(96)STOFFYN A. & STOFFYN P. & MARTENSSON E., I968:BBA I52,353
(97)RYHAGE R. & STENHAGEN E. & VON SYDOW E.
I957:Acta Chem.Scand.II,I80
RYHAGE R. & STENHAGEN E., I960:Arkiv Kemi I5,545
(98)FRIEDEL R.A.,SHULTZ J.L. & SHARKEY A.G.
I956:Anal.Chem.28,926
(99)KOCHETKOV N.K. & CHIZHOV O.S.
I966:Adv.in Carbohyd.Chem.,2I,39
ROSENTHAL,A.
I968:Carbohyd.Res.,8,6I
(I00) FISKE S.
I966: J. Microscopy, 5,355
(I0I) ACCORSI W.R,HAAG H.P, de MELLO F.A.F,BRASIL SOBRINKO M.O.C
I960:An.Esc.Agric,LUIS de QUEIROS BRAS 17,3

(I02) ASHBY W.B.,MIKA A.S.,
I959 :Bot.Gaz., I2I,28

(I03) BERTRAND G., GHITESCU V.
I934:C.R.Acad.Agri&,20,I052

(I04) BENTLEY C.F,GAREAUL,L.RENNER R.,Mc ERLOY L.W.
I956:Canad.J.Agric.Sci,70-27

(I05) BIDULPH O.
I953: KANSAS Agr. Exp. Sta Rep. 4,48

(I06)BISWAS B.B,SEN P.
I959/ Ind.J.Plant Physiol. 2,I

(I07)BKESDE R.W.,BLASER R.E.
I947:J.Amer.Soc.Agron.,39,I46

(I08)BOIS/CHOT P.,DROIUNO G.
C.R.Acad.Agric.,24,236

(I09) BROUWER R.
I965:An.Rev.Plant Physiol.I6,24I

(II0)BRZOZOWSKA J. HANOWER P.
I964:Oléagineux,19,663

(III)BUGAKOVA A.N.
I959-I96I DOLK.Akad.Nauk.S.S.S.R,I4I,I236

(II2)BURKHART L.,COLLINS E.R.
I94I:SOIL Sci.Agron.33,743

(II3)BURSTROM H.
I96I:FORTSCHR.Bot.23,206

(II4)CAIRNS R.R.,CARSON R.B
I96ICanad.J.Plant Sci.4I,709

(II5)CHAPMAN H.D.,BROWN S.M.
I94I:HILGARDIA,I4,I85

(II6)CHARLIER N.,CARPENTIER L.J
I956:Bull.Doc.ISMA I9,I

(II7)CHILD R.
I957:Tea.Res.East.Afr.Pamphl.I4

(II8) COIC Y.,LEFEVRE J.L.
I960:C.R.Acad.Agric.46,436

(II9)CRAFTS A.S.CURRIER H.B,STOCKING C.R.
I949:Water:Water in Physiol.of Plants p.I68

(I20)CRANE F.A,STEWART F.C
I962:Cornell Univ.Agric.Exp.Sta.Mem. 379,9I

(I2I)DIJKSHOORN W.,LAMPE J.E.M.,VAN BURGE P.F.J.
I960:Plant and Soil 13,227

(I22)DOHLMAN C.H.
I957':Arkiv.f,Kemi, II,255

(I23)EATON S.V., I95I:BOT Gaz II2,300.
(I24)EPSTEIN E.,I960:Amer J.Bot.47,393
(I25)ERGLE D.R., I954:Bot .Gaz. II5,225
(I26)ETTALA T.,VIRTANEN A.I.
I962:Acta Chem.Scand.,I6,205I
(I27)FRIC.F.,KOLEK J., I962:Biologia, (BRATISLAVIA),I7,
697
(I28)FUJIWARA A.,TORII K.,TOHOKU J.
I96I:J.Agric.Res.,I2,277
(I29)GOLA G.
I902:MALPEGHIA I6,368
(I30)GREENWOOD M.
I954:Intern.Soc.Soil SCI 5ème Congr.,3,274
(I3I)GURNASSON O., I960:Grunforbatring I3,I3
(I32)HANOWER J.,DRØØZOWSKA J.
I964:Agrochinica,8,263
(I33)HARWARD M.E.,CHAO T.T,FANG S.C, I96 2:Agron.J.54,IOI
(I34)HEISERICH E.S. Z.f.Pflanzener D.B.
I955:Z.f.Pflanzenern,37,35
(I35)HOROWITZ N.H., I950:Adv.Génét., 3,33
(I36)ISHIMOTO M.,FUJIMOTO D.
I959:Proc.Jap.Acad.,35,243
(I37)JOHANSSON O.
I959:Ann.Roy.Agro.Coll.Sweden,25,57
(I38)JORDAN H.V.,ESMINGER L.E., I958:Adv.Agron.,I0,407
(I39)KAWASHOMA N. ASAHI T., I96I:J.Biochem.Tokyo 49,52
(I40)KURSANOV O.A.,HOWELL R.W
I962:IZVEST.Akad.Nauk.SSSR Ser.Biol.,5,740
(I4I)BERTRAND D., I949:Presses Universitaires
(I42)BERTRAND D.
I959:Traité de biochimie générale de Javillier
et Polonowski
(I43)POLONOWSKI M., I95I:Bull.Soc.Sci.Hyg.Alim.,39,I
(I44)DEMOLON A. et MARQUIS A., I949:Presses Universitaires
(I45)VAN WAZER J.R., I96I:Wiley Intersc.N.Y.
(I46)KATCHMAN B.J.
Phosphates in life processes (5)Vol II p.I280
(I47)Mc ELROY W.D. & GLASS B.
I952:The Johns Hopkins Press Baltimore.

(I48)LIPMANN F., Adv. Enzymol. I94I,I,99
(I49JOHNSTON F.A.,DEBROCK L. & DIAO E.F.
I958:Amer.J.Clin.Nutrit.,6,I36
(I50)HORIGUCHI M. & KANDATSU M., I959:Nat.,I84,90I
(I5I)GREEN D.E.,FLEISCHER S., I964:J.Wiley édit.p.58I
(I52)MEYERHOF O., I937:Ergbn.Physiol.,39,IO
(I53)BUCHAMAN J.M.,HARTMAN J.C, I959:Adv.Enzymol.2I,I99
(I54)HOKIN L.E. & HOKIN M.R., I963:Feder.Proc,22,8
(I55)NIGHTTNGALE G.T. SCHERMERHORN L.G.,ROBBINS W.R.
I932:Plant physiol.,7 ,565
(I56)RAGLAND J.B.,LIVERMAN J.L
I958:Arch.Biochimie,Biophysique,76,496
(I57)THOMAS M.D. HENDRICKS H.R,BRYNER L.C,HILL G.R
I944:Plant Physiol.I9,227
I950:SOIL Sci,70,I9
(I57)ULRICH J.M,LUSE R.A,MC LAREN A.D
I964:Physiol.Plantarum I7,683
(I58)WOOD J.G., BARRIEN B.S., I942:Chronica botanica,7,I
(I59)HELLER R., C.R.Acad.Sc I955,24I,234
(I60)WEIGL J.ZIEGLER H., I962:Planta 58,435